

119992, Россия, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.11

Тел./Факс (495) 939-59-67, тел. 939-58-06; www.bcmst.ru, E-mail: info@bcmst.ru

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта

Охратоксин А

МОСКВА

2008

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении микотоксина охратоксина А в продовольственном сырье, пищевых продуктах и кормах. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает степень извлечения определяемого микотоксина.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов в определении микотоксинов методом твёрдофазной экстракции с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

I. Цель и назначение Аналитического комплекта Охратоксин А

I.1. Цель выпуска комплекта Охратоксин А

Целью выпуска Аналитического комплекта *Охратоксин А* является обеспечение воспроизводимых условий пробоподготовки и хроматографического анализа образцов фуражного зерна и кормов, испытание которых на возможное содержание охратоксина А предусмотрено основным документом "О МДУ микотоксинов в кормах", утв. Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР, №434-17 от 1.02.1989 г.

Аналитический комплект *Охратоксин А* может быть с успехом использован также при пробоподготовке и анализе образцов продовольственного сырья и продуктов питания при их профилактическом контроле на возможное содержание охратоксина А в диапазоне 0.01÷10 мг/кг.

I.2. Назначение комплекта Охратоксин А

Аналитический комплект *Охратоксин А* предназначен для реализации стандарта ISO 15141-2 на количественное определение в зерновых, а также оригинального экспресс-метода массового скрининга в зерновых и кормах охратоксина А методами высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ), соответственно.

Международные стандарты ISO 15141-1 и ISO 15141-2 описывают два способа экстракции охратоксина А из подкисленной пробы – толуолом и хлороформом. Их русскоязычные версии приведены в книге «Зерно. Контроль качества и безопасности по международным стандартам», М., Протектор, 2001. В качестве базового мы выбрали второй вариант как в наибольшей степени

отвечающий практическим условиям контрольных лабораторий и испытательных центров.

1.3. Особенности комплекта Охратоксин А

Характерными особенностями комплекта *Охратоксин А* являются:

- ⇒ Наличие двух альтернативных схем подготовки проб, одной арбитражной, получившей международное признание (ISO 15141-2, а ранее – AOAC Int. Official Method 991.44), другой – новой экспрессной, использующих твердофазную экстракцию с применением концентрирующих патронов "ДИАПАК" (ЗАО "БиоХимМак СТ", г. Москва);
- ⇒ Возможность организации быстрого скрининга потенциально «опасных» образцов сочетанием экспресс-метода подготовки проб с ТСХ - определением;

Эти особенности позволяют аналитику выбрать одну из двух схем пробоподготовки как для полуколичественной оценки содержания охратоксина А методом ТСХ, так и для точного количественного определения методом ВЭЖХ на традиционных жидкостных хроматографах зарубежных фирм и на отечественных хроматографах серий "Милихром".

II. Состав комплекта¹ *Охратоксин А*

1. Набор концентрирующих патронов для пробоподготовки методом твердофазной экстракции, обеспечивающий подготовку не менее 250 единичных проб для определения охратоксина А и включающий патроны ДИАПАК С16 М и ДИАПАК АМИН- М, выпускаемые по ТУ 4215-002-05451931-94, в количестве по 25 шт.
2. Стандартный раствор в бензоле (ацетонитриле) охратоксина А объемом 1 мл в ампуле (1 шт.) с рабочей концентрацией 50

¹ Общелабораторное оборудование и растворители в состав набора не входят, их варианты приведены в ISO 15141-1 и ISO 15141-2.

мкг/мл (точное значение концентрации охратоксина А указывается в прилагаемом паспорте).

3. Средство разделения:

- пластины тонкослойные хроматографические “Сорбфил” типа ПТСХ-Аф-В, 10x10□□см, 50 шт., комплект *Охратоксин А-ТСХ*;
- колонка хроматографическая Eurospher-C18, Kromasil-C18, ДИАСФЕР-110-С16 или С18, 5-7 мкм, 4x150 (250) мм, для импортных хроматографов (колонка **ТИП 1**);
- колонка хроматографическая ДИАСФЕР-110 С16, 5-7 мкм, 2x80 мм, для хроматографов “Милихром-4(5)” (колонка **ТИП 2**).

4. Инструкция по применению комплекта *Охратоксин А*.

III. Порядок проведения пробоподготовки

III.1. Отбор пробы и экстракция охратоксина А

Традиционная экстракция. Размолоть лабораторную пробу, просеять через сито и тщательно перемешать. Взвесить с точностью до 0.1 г 50 г подготовленной пробы в стакан смесителя, добавить 250 мл хлороформа, а затем 25 мл 0.1 М фосфорной кислоты. Перемешивать в течение 3 мин на средней скорости. Перед окончанием перемешивания добавить 10 г (45 мл) диатомита (например, Celite 545). Отфильтровать экстракт через пористый стеклянный фильтр, покрытый около 10 г диатомита, или через складчатый бумажный фильтр. Отобрать не менее 50 мл фильтрата.

Переэкстракцию охратоксина А в водный раствор бикарбоната натрия рекомендуется проводить следующим образом:

⇒ перенести 50 мл отфильтрованного хлороформного экстракта в делительную воронку на 100 мл, добавить 10 мл 3%

раствора бикарбоната натрия в дистиллированной воде и аккуратно встряхнуть;

⇒ добиться разделения фаз круговым вращением делительной воронки, а при образовании эмульсии – 2-х минутным центрифугированием при 2000 об/мин, и собрать верхнюю бикарбонатную фазу для дальнейшей очистки;

⇒ повторно проэкстрагировать хлороформный слой 10 мл 3% раствора бикарбоната натрия, объединить все бикарбонатные вытяжки в *бикарбонатный экстракт* и отбросить хлороформный слой.

Экспресс-вариант. В центрифужной пробирке на 25 мл взвесить 5.0 г тонко размолотой пробы и добавить сначала 12 мл *экстрагента* (смеси ацетонитрил-вода 84:16), а затем 2.5 мл 0.1 М фосфорной кислоты. Закрыть пробкой и интенсивно встряхивать вручную 2 мин, внести 5 г безводного сульфата натрия и снова встряхивать вручную 30 сек, после чего центрифугировать при 3000 мин⁻¹ в течение 5 мин. Использовать верхний *ацетонитрильный экстракт* для дальнейшей экспресс-очистки.

III.2. Очистка экстракта

Традиционная очистка. Рекомендуемый порядок очистки *бикарбонатного экстракта* на концентрирующем патроне ДИАПАК С16 М состоит в проведении следующего ряда операций.

III.2.1. Подготовка и регенерация патрона ДИАПАК С16М

⇒ Снять с патрона заглушки, прокачать через него с помощью шприца 5 мл этилового спирта, по 2 мл дистиллированной воды и 3% бикарбоната натрия и заглушить оба конца патрона; подготовленный таким образом патрон можно хранить в течение суток при температуре не выше 20°C.

⇒ Регенерация патронов Диапак С16М достигается проведением аналогичных операций, что обеспечивает не менее 10

определений охратоксина А на одном патроне. Использование патрона для подготовки более чем 10 единичных проб требует специальной проверки потребителем.

Ш.2.2. Очистка экстракта на патроне ДИАПАК С16М

⇒ Снять заглушки с подготовленного патрона, нанести на него с помощью шприца 10 мл *бикарбонатного экстракта* по п. Ш.1, промыть патрон последовательно 2 мл 0.1М раствора фосфорной кислоты и 2 мл дистиллированной воды, не допуская попадания на патрон воздуха и отбрасывая все смывы;

⇒ элюировать Охратоксин А с патрона 8 мл смеси этилацетат-этанол-уксусная кислота (95:5:0.5), собирая элюат в мерную пробирку с пришлифованной пробкой вместимостью 15 мл, содержащую 2 мл дистиллированной воды, закрыть пробкой, встряхнуть и дать расслоиться фазам;

⇒ с помощью пипетки отобрать верхнюю фазу (этилацетатный экстракт охратоксина А) и перенести в отгонную колбу, остатки верхней фазы дважды промыть этилацетатом в объеме 1 мл и присоединить к основной части в отгонной колбе;

⇒ упарить досуха на ротационном испарителе объединенный экстракт и растворить остаток в 0.1 мл смеси бензол-уксусная кислота (99:1) для проведения ТСХ-анализа или в 0.1-0.5 мл ($V_{пр}$) смеси ацетонитрил-вода (1:4) для проведения ВЭЖХ-анализа.

Экспресс-вариант. Рекомендуемый порядок экспресс-очистки *ацетонитрильного экстракта* на концентрирующем патроне Диапак Амин-М состоит в проведении следующего ряда операций.

Ш.2.3. Подготовка и регенерация патрона ДИАПАК Амин-М

- Снять с патрона заглушки, прокачать через него с помощью шприца 2 мл ацетонитрила и заглушить концы.
- Регенерация патронов достигается последовательным прокачиванием 2 мл смеси ацетонитрил-25% аммиак (99:1)

и 2 мл ацетонитрила, что обеспечивает не менее 10 определений охратоксина А на одном патроне. Использование патрона для подготовки более чем 10 единичных проб требует специальной проверки потребителем.

Ш.2.4. Очистка экстракта на патроне ДИАПАК Амин-М

- Нанести на подготовленный патрон с помощью шприца 8 мл *ацетонитрильного экстракта* по п. Ш.1., набрать в шприц 2 мл ацетонитрила и нанести на патрон, собирая все смывы в приемник для регенерации ацетонитрила.
- Элюировать охратоксин А 2 мл 0,5% муравьиной кислоты в ацетонитриле, собирая элюат в отгонную колбу на 5 мл, а затем упарить досуха на ротационном испарителе и растворить остаток в растворителях для ТСХ- или ВЭЖХ-анализа в соответствии с п. Ш.2.2.

IV. Особенности проведения ТСХ-анализа

IV.1. Порядок проведения ТСХ-анализа

Порядок проведения ТСХ-анализа и полуколичественной оценки содержания охратоксина А путем визуального сравнения интенсивностей флуоресценции пятен в длинноволновом УФ-свете до и после обработки раствором карбоната натрия или парами аммиака приведен в МР №3245-85 и ГОСТ 28001-88, соответственно. Общим недостатком описанных способов является громоздкость в проведении двумерной ТСХ.

Высокая степень очистки пробы и применение высокоэффективных пластин "Сорбфил" позволяют на практике ограничиться одномерным вариантом ТСХ-анализа в системе растворителей бензол-метанол-уксусная кислота (47:2:1), что резко повышает производительность аналитической работы, а

обнаружение охратоксина А проводить с использованием облучателя УФС-365 и устройства УСП-1.

Чрезвычайно выигрышным является сочетание ТСХ-оценки, проводимой полуколичественным методом (см. ниже), с экспресс-методом экстракции (п. III.1.) и очистки (пп. III.2.3. и III.2.4.). Его следует рекомендовать как при массовом анализе, так и скрининге «потенциально опасных» проб.

IV.2. Расчёт содержания охратоксина А

Расчет (полуколичественный) содержания охратоксина А в образцах зерна, зерно- и хлебопродуктов и кормов по данным ТСХ проводится по формулам, приведенным в МР №3245-85. Наличие в комплекте *Охратоксин А* стандартного раствора и нанесение его на каждую оцениваемую пластину (что делается с помощью отдельного микрошприца) повышают воспроизводимость полуколичественной оценки.

V. Особенности проведения ВЭЖХ-анализа

V.1. Особенности аналитического комплекта Охратоксин А

Порядок проведения ВЭЖХ-анализа охратоксина А в изократическом обращенно-фазовом режиме разделения в элюенте ацетонитрил-вода-уксусная кислота (99:99:2) описан в ISO 15141-1 с использованием флуориметрического детектора с длинами волн возбуждения и эмиссии, соответственно, 330-333 и 420-460 нм.

За счет применения градиентного элюирования и колонок меньшего размера (4x150 мм - **тип 1** и 2x80 мм - **тип 2**) в комплекте *Охратоксин А* удастся повысить реальную чувствительность определения и ограничиться использованием спектрофотометрического детектора с длиной волны 333 нм. При

этом диапазон определяемых содержаний охратоксина А в исходном продукте равен номинальному, т.е. 0.1-10 мг/кг (п. I.1.).

При необходимости контроля за содержанием охратоксина А в диапазоне $0.003 \div 0.1$ мг/кг рекомендуется применять флуориметрическое детектирование с сохранением градиентного режима элюирования в системе ацетонитрил-вода-уксусная кислота.

V.2. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

V.2.1. Приготовление элюентов

В двух мерных цилиндрах приготовить смеси ацетонитрил-вода-уксусная кислота в объемных соотношениях 20:80:1- *элюент А*, и 70:30:1-*элюент В*. Оба элюента профильтровать через мембранный фильтр с порами 0,45 мкм и провести их вакуумную или термическую дегазацию.

V.2.2. Подготовка хроматографической системы

Кондиционировать аналитическую колонку прокачиванием *элюента В* при номинальной скорости потока до прекращения дрейфа базовой линии используемого детектора. Установить следующие режимы градиентного элюирования для колонок соответствующего типоразмера:

- ⇒ **тип 1** - скорость потока 1.0 мл/мин, линейный градиент от 10 до 100% *элюента В* за 15 мин, объем вводимой пробы не более 50 мкл;
- ⇒ **тип 2** - скорость потока 100 мкл/мин, преформированный шестиступенчатый градиент в сосудах для элюентов №№ 6-1 УВПА хроматографа “Милихром- 4(5)” (состав и объемы ступеней, мкл, соответственно): *элюент А* - 700 мкл; смеси *А:В* - 4:1 - 300, 3:2 - 300, 2:3 - 300, 1:4 - 300, и *элюент В* - 600.

Объем регенерации - 400 мкл, объем вводимой пробы - не более 20 мкл.

Ориентировочное время удерживания охратоксина А составляет 12-15 мин (для колонки **тип 1**) и 15-17 мин (для колонки **тип 2**) и уточняется при градуировке хроматографа.

V.2.3. Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа осуществляют последовательным вводом в условиях п. V.2.2. номинального объема ряда растворов стандартного образца охратоксина А с концентрациями от 0.02 до 10 мкг/мл (с произвольным шагом в зависимости от ожидаемой концентрации в пробе и примененного детектора), растворенных в смеси ацетонитрил-вода (1:4) или в *элюенте А*. Для этого точно отмеренную аликвоту стандартного раствора охратоксина А в бензоле переносят в отгонную колбу минимального объема и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 50°C. Перерастворяют стандарт в равном аликвоте объеме смеси ацетонитрил-вода (1:4) или *элюента А*. Концентрация стандарта охратоксина А в этом растворе составит около 50 мкг/мл (точное значение указано в паспорте на стандартный образец). Растворы других концентраций получают методом последовательных разведений водным ацетонитрилом. После математической обработки полученных хроматограмм фиксируют площади пика охратоксина А, уточняют время удерживания и, при необходимости, строят градуировочный график.

V.2.4. Проведение ВЭЖХ-анализа

Номинальный объем подготовленной пробы по п. III.2.2. ввести не менее двух раз в хроматограф в режиме по п. V.2.2. После математической обработки хроматограмм провести идентификацию охратоксина А по параметрам удерживания и рассчитать среднюю площадь пика. По градуировочному графику определить концентрацию охратоксина А в подготовленной пробе в мг/мл.

V.1. Расчет содержания охратоксина А

Количественный расчет содержания охратоксина А в образцах зерна, зерно- и хлебопродуктов, а также кормов проводится по формуле:

$$C_{\text{Пр}} = \frac{C_{\text{Охр А}} \cdot V_{\text{Пр}}}{M_{\text{Э}}} \cdot 1000 \quad (\text{V.1})$$

где: $C_{\text{Пр}}$ – определяемое содержание охратоксина А в продукте, мг/кг;

$C_{\text{Охр А}}$ – концентрация охратоксина А в подготовленной пробе, определенная по градуировочной зависимости, мг/мл;

$V_{\text{Пр}}$ – объем подготовленной пробы, мл;

$M_{\text{Э}}$ – эквивалентная масса пробы, взятой на анализ, г (равна 5 г для традиционного и 4 г – для экспресс-варианта).

Разработал: _____/Васияров Г.Г./
_____ /Алексеева Г.С./

“ _____ “ _____ 2008 г

Для заметок



Закрытое Акционерное Общество “**БиоХимМак СТ**”

Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1 стр.11

тел./факс (495) 939-59-67, 939-58-06 /офис/,

(499) 135-88-14 /лаборатория/

www.bcmst.ru E-mail:info@bcmst.ru