

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта

Афлатоксин M₁

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении афлатоксина M₁ в молоке и молочных продуктах. 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

I.1. Цель выпуска Аналитического комплекта

Целью выпуска Аналитического комплекта *Афлатоксин M₁* является обеспечение воспроизводимой количественной пробоподготовки и последующего хроматографического анализа образцов жидкого молока, кисломолочных напитков и сметаны, испытание которых на возможное содержание афлатоксина M₁ предусмотрено основным документом "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов", СанПиН 2.3.2.560-96, М., Изд. Госкомсанэпиднадзора России, 1997.

Номинальный диапазон определяемых содержаний афлатоксина M₁ в молоке и молочных продуктах составляет 0.0001-0.001 мг/кг продукта.

I.2. Назначение Аналитического комплекта

Аналитический комплект *Афлатоксин M₁* предназначен для концентрирования и тонкой очистки образцов жидкого молока, а также очистки хлороформных экстрактов кисломолочных напитков и сметаны от компонентов, мешающих определению афлатоксина M₁ методами высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографии, описанными в следующих нормативных документах:

- "Методические рекомендации по обнаружению, идентификации и определению содержания афлатоксинов в пищевых продуктах", утв. МЗ СССР № 2273-80;

- "Методические рекомендации по количественному контролю за содержанием афлатоксинов в продуктах животного происхождения", утв. МЗ СССР № 3942-85;
- "Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания афлатоксинов в продовольственном сырье и пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии", утв. МЗ СССР № 4082-86.

1.3. Особенности Аналитического комплекта

Характерными особенностями комплекта *Афлатоксин М₁* являются:

- ⇒ Прямое нанесение и концентрирование молока методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК С16М;
- ⇒ Очистка целевой фракции афлатоксина М₁ молока, кисломолочных напитков и сметаны на патронах ДИАПАК С;
- ⇒ Близкий к количественному выход афлатоксина М₁ (80%);
- ⇒ Высокая степень очистки от примесей;
- ⇒ Широкое использование техники вакуумирования при твердофазной экстракции, включая применение вакуумного манифолда "Доркус" для одновременной подготовки до 12 проб (поставляется ЗАО "БиоХимМак СТ").

Эти особенности позволяют реализовать единую схему пробоподготовки как для полуколичественной оценки содержания афлатоксинов методом ТСХ, так и для точного количественного определения методом ВЭЖХ на традиционных жидкостных хроматографах

зарубежных фирм и на отечественном хроматографе "Миличром". Такой комплексный подход к анализу афлатоксинов разработан в России впервые.

Использованный методологический подход соответствует официальному методу, принятому Международной ассоциацией химиков-аналитиков (ст. 986.16 AOAC Official Methods of Analysis, 16th Edition (1995)).

II. Состав Аналитического комплекта¹

1. Комплект концентрирующих патронов ДИАПАК С16М, обеспечивающий подготовку 100 единичных проб для определения афлатоксина М₁ методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), в количестве 100 шт.,
2. Комплект концентрирующих патронов ДИАПАК С обеспечивающий тонкую очистку 100 единичных проб методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), в количестве 100 шт.,
3. Корпус с фильтром для осушительной колонки (2 шт.).
4. Средство разделения:
 - колонка ДИАСФЕР-110-С16, 4x150 мм, для хроматографа Кнауер или любых импортных хроматографов, снабженных флуориметрическим детектором (ФМД), 1 шт. (колонка **ТИП 1**);

¹ Общелабораторное оборудование и растворители в состав набора не входят, их варианты приведены в МР №2655-82 и ГОСТ 28038-89.

Состав Аналитического комплекта

- колонка ДИАСФЕР-110-С16, 2x80 мм, для хроматографа “Милихром-5-7” с ФМД, 1 шт (колонка **ТИП 2**);
 - пластины тонкослойные хроматографические ПТСХ-АФ-В 10x15 см, 50 шт. (Комплект *Афлатоксин M₁-ТСХ*).
5. Стандартный раствор афлатоксина M₁ объемом 1 мл в ампуле (1 шт.) с рабочими концентрациями (точное значение концентрации указывается в прилагаемом паспорте), свидетельство о метрологической аттестации и общая инструкция по применению стандартного образца прилагаются:
- 0,3÷1 мкг/мл в смеси бензол-ацетонитрил (ТСХ);
 - 1,0 мкг/мл в смеси бензол-ацетонитрил (ВЭЖХ).
6. Пластиковая колонка с фильтром (воронка)- (2 шт.).
7. Инструкция по применению комплектов *Афлатоксин M₁* и *Афлатоксин M₁-ТСХ*.

III. Порядок проведения пробоподготовки

III.1. Подготовка пробы к анализу

III.1.1. Подготовка концентрирующих патронов

1. Концентрирующие патроны ДИАПАК С16М

Подготовка к работе патронов выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;

⇒ Прокачать через патрон ДИАПАК С16М последовательно по 5 мл ацетонитрила и воды;

При необходимости провести испытания патрона ДИАПАК С16М в соответствии с МУК 4.1.787-99 (п. 4.3. пп. 6 прилож. 1);

2. Концентрирующие патроны ДИАПАК С

Подготовка к работе патронов выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;

⇒ Прокачать через патрон ДИАПАК С 5 мл бензола;

Перед началом эксплуатации провести испытания в соответствии с МУК 4.1.787-99 (п. 4.2. прилож. 1) для установления оптимального объема элюирования афлатоксина с патрона ДИАПАК С.

Ш.1.2. Подготовка, концентрирование и очистка пробы молока

⇒ Пробу молока объемом 50 мл центрифугировать на подходящем оборудовании в течение 5 мин при 1000 об/мин. Для определения афлатоксина М₁ отобрать 20 мл супернатанта, избегая попадания жира;

⇒ Сухое молоко растворить в соответствии с инструкцией или соответствующим ТУ и обработать, как описано выше;

⇒ 20 мл подогретой до 40°C пробы пропустить через подготовленный патрон ДИАПАК С16М со скоростью 3 капли в секунду, патрон промыть 5 мл бидистиллированной воды, отбросив смывы, и просушить воздухом в течение 1 мин. Патрон промыть 10 мл сухого гексана и вновь просушить воздухом в течение 1 мин;

⇒ Элюировать афлатоксин М₁ 6 мл хлороформа, обмыть приемник 1 мл хлороформа и пропустить объемы самотеком через 10 г безводного сульфата натрия (2-3 см на ватном тампоне в конической воронке), собрав *экстракт М*.

Ш.1.3. Подготовка проб сметаны и кисломолочных напитков

⇒ Навеску 20 г сметаны или 40 г кисломолочного напитка поместить в коническую колбу вместимостью 250 мл и добавить 10 мл водного раствора, содержащего 2 г хлорида натрия и 0.24 г лимонной кислоты, и 100 мл хлороформа (составные части подогреть до температуры 35-38°C);

⇒ Встряхивать содержимое колбы 2-3 мин, перенести в центрифужные стаканы и центрифугировать в течение 15 мин при 3000-4000 об/ мин;

⇒ Отделить нижний хлороформный слой, пропустить самотеком через 10 г безводного сульфата натрия, измерить объем фильтрата ($V_{\text{ф}}$) и упарить до 5-6 мл *экстракт М*.

III.2. Тонкая очистка пробы

⇒ *Экстракт М* нанести на подготовленный патрон ДИАПАК С со скоростью 1-2 капли в секунду. Промыть сульфат натрия (III.1.2, III.1.3.) 1 мл хлороформа и после прекращения скапывания предыдущей порции нанести на патрон;

⇒ Элюировать афлатоксин M_1 10 мл смеси ацетон-хлороформ (1:4) или 7 мл смеси метаннол-хлороформ (1:19) и упарить досуха на ротационном испарителе или в слабом токе азота при температуре не выше 40°C;

Немедленно! Перерастворить пробу :

⇒ в 0.1 мл смеси ацетонитрил-бензол (1:9) или хлороформа для ТСХ-анализа;

⇒ в 0.25 мл смеси вода-ацетонитрил (9:1) для ВЭЖХ-анализа на хроматографе “Knauer” или любом импортном;

⇒ в 0.1 мл смеси вода-ацетонитрил (9:1) для ВЭЖХ-анализа на хроматографе “Милихром”.

IV. Особенности ТСХ-анализа

IV.1. Порядок проведения ТСХ-анализа

Порядок проведения ТСХ-анализа и полуколичественной оценки содержания афлатоксинов путем визуального сравнения интенсивностей флуоресценции пятен в длинноволновом УФ-свете приведен в МР № 2273-80, МР № 3942-85 и МУ № 4082-86. Общим недостатком описанных способов является громоздкость двумерной ТСХ.

Высокая степень очистки пробы и применение в Аналитическом комплекте *Афлатоксин М₁-ТСХ* высокоэффективных пластин "Сорбфил" позволяют на практике ограничиться **одномерным вариантом ТСХ-анализа** в смеси растворителей хлороформ-ацетон-изопропиловый спирт (78:12:10), а обнаружение афлатоксина М₁ проводить по стандартной методологии, принятой в МУ № 4082-86, с использованием облучателя УФС-365 и устройства для сушки пластин УСП-1 (АО "Машиностроитель", г.Краснодар), что резко повышает производительность аналитической работы.

Высокая интенсивность УФ-излучения, реализуемая облучателем УФС-365, повышает чувствительность определения афлатоксина М₁ и облегчает его идентификацию по изменению цвета флуоресценции после опрыскивания пластин.

IV.2. Расчёт содержания афлатоксина М₁

Полуколичественный расчет содержания афлатоксина М₁ в образцах молочных продуктов по данным ТСХ проводится с учетом эквивалента массы пробы по формуле:

$$A_x = \frac{M_x \cdot V_{\Pi}}{V_x \cdot M_{\text{Э}} \cdot 1000}; \text{ где} \quad (\text{IV.1.})$$

A_x – содержание микотоксина в пробе, мг/кг;

M_x – определенная масса микотоксина в пробе, нг;

V_{Π} – объем *пробы* молока по п. III.1.2. и п. III.1.3, мл;

V_x – объем *пробы*, нанесенный на пластину, мкл;

$M_{\text{Э}}$ – эквивалент массы пробы молока, взятой на анализ составляет 20 г.

Эквивалент массы пробы **сухого молока** рассчитывается по формуле:

$$M_{\text{Э}} = \frac{m}{V} \cdot 20; \text{ где} \quad (\text{IV.2.})$$

$M_{\text{Э}}$ – эквивалент массы пробы, взятой на анализ, г;

m – масса пробы сухого молока, г;

V – объем воды для растворения навески сухого молока, мл.

Эквивалент массы пробы сметаны или кисломолочных напитков рассчитывается по формуле:

$$M_{\text{Э}} = \frac{V_{\Phi}}{100} m_{\text{ПР}}; \text{ где} \quad (\text{IV.3.})$$

$M_{\text{Э}}$ – эквивалент массы пробы, взятой на анализ, г;

V_{Φ} – объем фильтрата по п. III.1.3., мл;

$m_{\text{ПР}}$ – масса пробы сметаны или напитка, г;

Наличие в Комплекте *Афлатоксин М₁ –ТСХ* стандартного раствора афлатоксина М₁ и нанесение его на каждую пластину (что рекомендуется делать с помощью отдельного микрошприца) повышают воспроизводимость полуколичественной оценки содержания афлатоксина М₁ в образцах, что позволяет рекомендовать ТСХ-анализ в качестве первичного быстрого и дешевого метода испытаний молока и молочных продуктов на содержание афлатоксина М₁.

V. Особенности ВЭЖХ-анализа

V.1. Особенности Аналитического комплекта

Порядок проведения ВЭЖХ-анализа афлатоксина М₁ в изократическом нормально-фазовом режиме разделения на колонке с силикагелем в элюенте эфир-метанол-вода (90:8:2) описан в МУ № 4082-86 с использованием флуориметрического детектора с заполненной силикагелем кюветой и длинами волн возбуждения и эмиссии 360 и 420 нм, соответственно.

Применение градиентного обращенно-фазового режима разделения на колонках ДИАСФЕР-110-С16 (**ТИП 1**) в Аналитическом комплекте *Афлатоксин М₁* позволяет повысить реальную чувствительность определения в указанных условиях детектирования, но на стандартной (т.е. не заполненной силикагелем) измерительной кювете.

В этом же режиме разделения и детектирования реализован ВЭЖХ-анализ афлатоксина М₁ на отечественном микроколоночном хроматографе “Милихром-5-7”, снабженном колонкой ДИАСФЕР-110-С16 (**ТИП 2**). При этом диапазон определяемых содержаний афлатоксина М₁ в исходном продукте также равен номинальному по п. I.1.

Важным преимуществом комплекта является применение в качестве элюентов бинарных смесей вода-ацетонитрил, что обеспечивает возможность регенерации ацетонитрила и сокращение стоимости единичного анализа.

V.2. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

V.2.1. Приготовление элюентов

В трех мерных цилиндрах приготовить смеси ацетонитрил- вода в объемных соотношениях: (1:9) - элюент *A*, (2:8) - элюент *B* и (7:3) - элюент *B*, профильтровать через мембранный фильтр с порами 0.45 мкм и провести вакуумную или термическую дегазацию.

V.2.2. Условия хроматографического анализа

⇒ На хроматографах “Кнауер” или любых других зарубежных фирм (колонка **тип 1**) - линейный градиент от 10 до 90% элюента *B* в *A* за 15 мин при скорости потока 1.0 мл/мин, объем пробы- не более 0.05 мл, время удерживания- 7-8 мин.

⇒ На хроматографе “Милихром-5-7” – преформированный ступенчатый градиент в сосудах для элюентов NN 8-1 (составы и объемы ступеней, соответственно): элюент *B*-700 мкл, смеси *B* и *B*: (9:1)-300, (4:1)-300, (7:3)-200, (3:2)-200, (2:3)-200, (1:4)-300, элюент *B*-300. Объем регенерации- 400 мкл (элюент *B*), объем пробы – 50 мкл, скорость потока – 100 мкл/мин, время удерживания – 12 мин.

V.2.3. Подготовка хроматографической системы

⇒ Установить на хроматограф колонку ДИАСФЕР-110-С16 соответствующего типоразмера и стабилизировать в условиях холостого градиента, контролируя уровни шума и дрейфа базовой линии по ФМД на длинах волн детектирования;

Хроматограф считается подготовленным, а колонка стабилизированной, если уровни шума и дрейфа базовой линии соответствуют таковым на специальной тестовой хроматограмме афлатоксина M_1 , поставляемой с аналитической колонкой.

V.2.4. Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа осуществляют последовательным вводом в условиях п. V.2.2. номинального объема ряда растворов стандартного образца афлатоксина M_1 с концентрациями от 0.001 до 0.1 мкг/мл (с произвольным шагом в зависимости от ожидаемой концентрации в пробе) Для этого стандартные растворы для ВЭЖХ (имеются в комплекте) разводят бидистиллированной водой или **элюентом А** в нужное число раз, учитывая точную концентрацию, указанную в паспорте афлатоксина.

При необходимости перевода в водный ацетонитрил стандартных растворов афлатоксина M_1 для ТСХ точно отмеренную аликвоту раствора переносят в отгонную колбу минимального объема и упаривают досуха на ротационном испарителе или в слабом токе азота при температуре не выше 40°C. Немедленно перерастворяют стандарт в равном аликвоте объеме **элюента А**. Растворы других концентраций получают методом последовательных разведений.

После математической обработки полученных хроматограмм зафиксировать времена удерживания и площади пиков афлатоксина M_1 и, при необходимости, построить градуировочные графики.

V.2.5. Проведение ВЭЖХ-анализа

Номинальный объем подготовленной **пробы M** ввести не менее двух раз в хроматограф в режиме по п. V.2.2.

После математической обработки хроматограмм провести идентификацию афлатоксина M₁ по параметрам удерживания и рассчитать среднюю площадь пиков.

По градуировочным графикам методом абсолютной градуировки определить концентрацию афлатоксина M₁ в подготовленной пробе.

V.3. Расчет содержания афлатоксин M₁

Количественный расчет содержания афлатоксина M₁ в образцах молока, кисломолочных напитков и сметаны проводится с учетом эквивалента массы пробы по формуле:

$$C_{\text{пр}} = \frac{C_{\text{х}} \cdot V_{\text{х}}}{M_{\text{э}}} \cdot 1000, \text{ где} \quad (\text{V.1.})$$

C_{пр} – определяемое содержание афлатоксина M₁ в пробе, мг/кг;

C_х – концентрация афлатоксина M₁ в **пробе**, определенная по градуировочной зависимости, мг/мл;

V_х – объем **пробы** по III.2., мл;

M_э – эквивалент массы пробы (п. IV.2.), взятой на анализ, г.

Разработал: _____ / Васияров Г.Г./

_____ /Алексеева Г.С. /

“ “ _____ 2000 г.

Для заметок

Для заметок



Закрытое Акционерное Общество “БиоХимМак СТ”

Россия, 119899, Москва, Ленинские горы
тел./факс (095) 939-59-67 939-58-06/офис/,
939-36-66 /лаборатория/
e-mail bcmst@bcm.chem.msu.ru