

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ  
АФЛАТОКСИНОВ В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ  
С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

Афлатоксины представляют собой токсины, продуцируемые микроскопическими грибами *Aspergillus flavus* и *A. Parasiticus*. В естественных условиях афлатоксины загрязняют арахис, кукурузу, некоторые зерновые, бобы какао и ряд других пищевых продуктов, а также корма сельскохозяйственных животных. Загрязнение афлатоксинами является серьезной проблемой для сельскохозяйственной продукции растительного происхождения из стран и регионов с субтропическим климатом. Оптимальные условия для образования афлатоксинов могут также возникнуть при неправильном хранении сельскохозяйственной продукции, например при самосогревании зерна.

В естественных условиях встречаются 4 афлатоксина: афлатоксины В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> (синяя флуоресценция в длинноволновом диапазоне УФ свете) и афлатоксины G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub> (сине-зеленая флуоресценция). Среди них высокими токсическими свойствами и наиболее широкой распространенностью выделяется афлатоксин В<sub>1</sub>.

С молоком коров, потреблявших корма, загрязненные афлатоксинами В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub>, может выделяться до 3% потребленных афлатоксинов в виде соответствующих гидроксилированных метаболитов - афлатоксинов М<sub>1</sub> и М<sub>2</sub>.

Биологическая активность афлатоксинов проявляется в виде как острого токсического эффекта, так и отдаленных последствий - канцерогенного, мутагенного и тератогенного эффектов. В настоящее время существуют убедительные эпидемиологические данные, указывающие на прямую корреляцию между частотой первичного рака печени и уровня содержания афлатоксинов в пищевых продуктах в ряде стран Юго-Восточной Азии.

В СССР установлены ПДК на содержание афлатоксина В<sub>1</sub> в пищевых продуктах на уровне 5 мкг/кг. Для производственного сырья, предназначенного для производства продуктов детского питания, и готовых продуктов детского и диетического питания установлена ПДК афлатоксина В<sub>1</sub> на уровне 1 мкг/кг (предел чувствительности ТСХ-метода). Для молока и молочных продуктов установлена ПДК афлатоксина М<sub>1</sub> на уровне 0.5 мкг/кг.

В основе настоящих методических указаний лежит метод определения афлатоксинов по изменению интенсивности их флуоресценции при высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или по поглощению Уф света при использовании Уф-детектора. Качественное подтверждение наличия афлатоксинов проводят с помощью двумерной ТСХ. Предел обнаружения метода для афлатоксина В<sub>1</sub> - 0.1 мкг/кг, для афлатоксина М<sub>1</sub> - 0.02 мкг/кг (при использовании флуоресцентного детектора) и 1.0 мкг/кг для афлатоксина В<sub>1</sub>, 0.5 мкг/кг для афлатоксина М<sub>1</sub> (при использовании Уф-детектора). Относительное стандартное отклонение метода составляет 0.05-0.1. Степень извлечения афлатоксина В<sub>1</sub> 78-80%, афлатоксина М<sub>1</sub> 72-76%. Продолжительность анализа 2-2.5 часа.

Метод включает следующие стадии:

- экстракцию афлатоксинов из образца;
- очистку экстрактов от белков, липидов, пигментов;
- разделение, идентификацию и определение содержания афлатоксинов с помощью нормально фазовой ВЭЖХ с флуоресцентным или ультрафиолетовым детекторами.

Методические указания предназначены для использования лабораториями институтов гигиенического профиля и базовых санэпидстанций, осуществляющих контроль за импортируемой продукцией, а также при изучении частоты и уровней загрязнения пищевых продуктов и продовольственного сырья афлатоксинами. Настоящие методические указания могут использоваться наряду с действующими в настоящее время "Методическими рекомендациями по обнаружению, идентификации и определению содержания афлатоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье" №2273-80, отличаясь от последних более высокой чувствительно-

стью и воспроизводимостью методов анализа, а также сокращенным временем проведения анализа.

## ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. Аппарат для встряхивания проб типа АБУ-6С, ТУ 64-1-2451-78;
2. Ротационный испаритель с ловушкой, модель ИР-2М, по ТУ 25-11-917-76 (завод "Химлабприбор") или аналогичный;
3. Кофемолка ЭКМ-3У;
4. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833), ТУ 64-1-1080-78 или диагностическая лампа ОЛД-41;
5. Жидкостный хроматограф высокой эффективности "Altex" модель 336 или другой хроматограф с аналогичными параметрами; колонка и предколонка с силикагелем типа "Ultrasphere Si", с размером частиц 5 мкм; длина колонки 25 см, предколонки 4.5 см, внутренний диаметр колонок 0.46 см; флуоресцентный детектор "Kratos" модель FS-970 с кюветой заполненной силикагелем или другой детектор с аналогичными параметрами; ультрафиолетовый детектор "Kratos";
6. Микрошприц на 25 мкл;
7. Стеклообразные камеры для ТСХ с притертыми крышками, например, стеклообразные четырех угольные сосуды 195x195x200 мм завода "дружная горка";
8. Пластины для ТСХ "Силуфол" размером 15x15 или 20x20 см, ЧСФР;
9. Воронки делительные ВД2-250 или ВД2-500, ГОСТ 8613-75;
10. Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 100-250 мкм (силикагель ЧСФР).
11. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 ГОСТ 1770-74;
12. Цилиндры мерные на 250 мл с притертой пробкой, тип 2-250 по гост 1770-74;
13. Колбы плоскодонные конические на 250 и 500 мл с НШ29 тип КнКШ 250-29/32 и КнКШ 500-29/32 по ГОСТ 10394-72;
14. Колбы круглодонные на 1000 мл с НШ29, тип ККШ 250-29/32 по ГОСТ 10394-72;
15. Колбы грушевидные на 50 мл с НШ 14.5, тип ГрКШ 50-14/23 по ГОСТ 10394-72;
16. Воронки химические диаметром 150 мм по ГОСТ 8613-75;
17. Колонка стеклообразная хроматографическая 2300x15 мм;
18. Распылитель стеклообразный с грушей;
19. Афлатоксин В<sub>1</sub> или смесь афлатоксинов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>;
20. Афлатоксин М<sub>1</sub>;
21. Ацетон, чда, ГОСТ 2603-71;
22. Гексан по ТУ 6-093375-73;
23. Бензол, чда, ГОСТ 5955-75;
24. Ацетонитрил, ч, ТУ 6-09-3543-74;
25. Метанол по ГОСТ 6995-77;
26. Хлороформ медицинский по ГОСТ 3160-51;
27. Эфир диэтиловый медицинский по ГОСТ 6265-52;
28. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709;
29. Кислота лимонная по ГОСТ 3652-29;
30. Кислота азотная концентрированная по ГОСТ 4461-67;
31. Сульфат натрия безводный по ГОСТ 4166-76;
32. Натрий хлористый по ГОСТ 4233-66;

33. Свинец уксуснокислый по ГОСТ 1027-67;  
34. Окись алюминия для колоночной хроматографии (нейтральный) 40/250 (ЧСФР).

## 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

### 1.1.ЭКСТРАКЦИЯ

При отборе проб следует руководствоваться требованиями ГОСТа 12330-66 "Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образца при карантинном досмотре и экспертизе". Отобранную пробу измельчают в течение 1-2 минут в кофемолке или лабораторной мельнице. Навеску 25 г измельченного продукта помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, тщательно перемешивают с 25 мл 10%-го раствора хлорида натрия. Добавляют 100 мл ацетона и встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбирают 50 мл фильтрата.

### 1.2.ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА

К 50 мл фильтрата добавляют 20 мл 15%-го раствора ацетата свинца и 30 мл дистиллированной воды, перемешивают и оставляют стоять на 10 минут в темноте. Отфильтровывают образовавшийся осадок через бумажный складчатый фильтр, отбирают 80 мл фильтра. Обезжиривают в делительной воронке гексаном (2x30 мл), затем переэкстрагируют в хлороформ (1-й раз 30 мл хлороформа, 2-й раз смесью хлороформ-ацетон 3:1 - 45 мл). Объединяют хлороформные экстракты помещают в плоскодонную колбу на 250 мл, добавляют 5-7 г безводного сульфата натрия, встряхивают и оставляют стоять на 30 минут в темноте. Раствор фильтруют через кусочек ваты, помещенный в химическую воронку, в грушевидную колбу. Хлороформный раствор упаривают на ротационном испарителе до объема 1 мл. Далее производят очистку экстракта с помощью колоночной хроматографии.

На дно стеклянной колонки помещают кусочек ваты, затем безводный сульфат натрия (толщина слоя 5 мм), наливают суспензию 2 г силикагеля в хлороформе, сверху насыпают слой безводного сульфата натрия (20). Дают хлороформу стечь, затем на колонку наносят хлороформный экстракт образца, элюируют смесью хлороформ-ацетон (9:1) 60 мл. Элюат упаривают досуха на ротационном испарителе, остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный или капроновый фильтр в пробирку емкостью 5 мл, отдувают растворитель в токе азота, остаток растворяют в 400 мкл хлороформа (раствор А) и анализируют с помощью ВЭЖХ.

### 1.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ РАСТВОРОВ АФЛАТОКСИНОВ В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>;

Стандартные растворы готовят следующим образом:

Навески кристаллических афлатоксинов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> в 1 мг помещают в мерные колбы на 100 мл и доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (98:2). Концентрации афлатоксинов в приготовленных стандартных растворах составляют 10 нг/мкл.

Для приготовления рабочего раствора смеси афлатоксинов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> с концентрациями 0.5 нг/мкл, 0.25 нг/мкл, 0.2 нг/мкл, 0.1 нг/мкл соответственно в мерную колбу на 50 мл помещают 2.5 мл стандартного раствора афлатоксина В<sub>1</sub>, 1.25 мл В<sub>2</sub>, 1.0 мл G<sub>1</sub> и 0.5 мл G<sub>2</sub>, затем доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (98:2).

Стандартный раствор хранится в холодильнике при температуре ниже 0°C, срок годности стандартного раствора 1 год.

#### 1.4. ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКИНОВ В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ.

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза эфир-метанол-вода (95:4:1), скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин. Рекомендуется использовать перегнанный метанол и бидистиллированную воду. Эфир перед использованием пропускают через колонку с оксидом алюминия. Все растворители необходимо предварительно отфильтровать. Флуоресцентный детектор устанавливается на длину волны возбуждающего излучения 360 нм (или устанавливают соответствующий фильтр на линии возбуждения при работе с флуоресцентным детектором без монохроматора), на линии эмиссии устанавливается эмиссионный фильтр с полосой пропускания от 418 нм. Входное напряжение самописца - 10мВ, чувствительность детектора устанавливается таким образом, чтобы 1 нг афлатоксина В<sub>1</sub> соответствовало отклонению пера на полную шкалу самописца при уровне шума от 3 до 5% от полной шкалы. Предел обнаружения при таких условиях составляет около 0.1 нг афлатоксина В<sub>1</sub> во вколе (при флуоресцентном детектировании).

Для калибровки прибора по флуоресцентному детектору в инжектор с помощью микрошприца вводится 1 мкл рабочего раствора для ВЭЖХ (соответствует 0.5 нг афлатоксина В<sub>1</sub>, 0.25 нг В<sub>2</sub>, 0.2 нг G<sub>1</sub>, 0.1 нг G<sub>2</sub>) и 2 мкл рабочего раствора (1 нг В<sub>1</sub>, 0.5 нг В<sub>2</sub>, 0.4 нг G<sub>1</sub>, 0.2 нг G<sub>2</sub>). Для каждого количества афлатоксинов определяют высоту пика. В приведенных выше условиях время выхода растворителя составляет 3.0-3.5 минуты, времена удерживания афлатоксинов: для В<sub>1</sub> 9.0-10.0 мин., для В<sub>2</sub> 11.0-11.8 мин., для G<sub>1</sub> 13.0-14.0 мин., для G<sub>2</sub> 15.6-17.0 мин. В зависимости от небольших изменений в составе подвижной фазы и времени уравнивания колонки.

При высоких уровнях загрязнения пищевых продуктов афлатоксинами (свыше 10 мг/кг по афлатоксину В<sub>1</sub>) рекомендуется использовать также показания УФ-детектора. Калибровку прибора по УФ-детектору проводят также, как в случае флуоресцентного детектора, вводя в петлю инжектора 10, 15 и 20 мкл рабочего раствора (соответствует 5, 7.5 и 10 нг афлатоксина В<sub>1</sub>; 2.5, 3.75, 5 нг афлатоксина В<sub>2</sub>; 2, 3 и 4 нг G<sub>1</sub>; 1, 1.5 и 2 нг G<sub>2</sub>). Предел обнаружения по УФ-детектору составляет 1 нг по афлатоксину В<sub>1</sub>.

В инжектор хроматографа вводится с помощью микрошприца 20 мкл раствора А. При наличии пика, совпадающего по времени с афлатоксином В<sub>1</sub> (В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) определяют его высоту (h). Расчет концентрации афлатоксина проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times V_3 \times V_5 \times m_{ст.} \times h}{V_2 \times V_4 \times V_6 \times M \times h_{ст.}} \text{ мкг/кг}$$

- Где С - концентрация афлатоксина в пищевом продукте в мкг/кг;  
V<sub>1</sub> - объем водно-ацетоновой смеси в мл (125 мл);  
V<sub>2</sub> - объем водно-ацетонового фильтрата, взятый для анализа в мл (50 мл);  
V<sub>3</sub> - объем водно-ацетонового фильтрата и раствора ацетата свинца (100 мл);  
V<sub>4</sub> - объем фильтрата после очистке ацетатом свинца (80 мл);  
V<sub>5</sub> - объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (400 мкл);  
V<sub>6</sub> - объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл);  
m<sub>ст.</sub> - количество нг афлатоксина во введенном объеме стандарта;  
h<sub>ст.</sub> - высота пика стандарта афлатоксина в мм;

h - высота пика афлатоксина во введенном объеме экстракта в мм;

M -навеска образца, взятая в г.

При проведенных в скобках объемах и навесках формула содержания афлатоксина выражается следующим образом:

$$C = 2.5 \frac{h}{h_{ст.}} \times m_{ст.}$$

Если пик афлатоксина выходит за пределы шкалы самописца, анализ с помощью ВЭЖХ, проводят повторно, уменьшая объем вводимого раствора экстракта ( $V_6$ ) или разбавляя раствор экстракта хлороформом (увеличивая объем  $V_5$ ). При необходимости подтверждения проводят совместный ввод экстракта со стандартом афлатоксинов.

## 1.5. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НАЛИЧИЯ АФЛАТОКСИНОВ В ПОМОЩЬЮ ДВУМЕРНОЙ ТСХ.

Для подтверждения наличия афлатоксинов пластинку "Силуфол" размечают тонкими карандашными линиями. В правом нижнем углу на расстоянии 1.5 см от краев наносят 20 мкл раствора А, в правом верхнем углу наносят 5 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов. В левом нижнем углу на расстоянии 1, 2 и 3 см от левого края и 1.5 см от нижнего края пластинки наносят 2, 5 и 10 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью эфир-метанол-вода (94:4.5:1.5) и развивают пластинку в 1-ом направлении до достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают и сушат на воздухе 5 минут, затем развитие пластинки проводят во втором направлении в системе хлороформ-ацетон-вода (90:10:1). После достижения фронтом растворителя карандашной линии ее извлекают из камеры и сушат на воздухе. Рассматривают пластинку в длинноволновом УФ-свете. Обнаружение на пластинке пятен, соответствующих по хроматографической подвижности и цвету флуоресценции пятнам стандартов афлатоксинов, свидетельствует о возможном присутствии афлатоксинов в пищевом продукте. Для подтверждения наличия афлатоксинов ТСХ-пластинку опрыскивают раствором азотной кислоты в воде (1:2) и рассматривают ее в длинноволновом УФ-свете. Если цвет флуоресценции стандартов афлатоксинов изменился с синего ( $B_1$ ,  $B_2$ ) или синне-зеленого ( $G_1$ ,  $G_2$ ) на желтый цвет, а цвет флуоресценции пятен экстракта на желтый не изменился, то афлатоксины в пробе отсутствуют. Если же цвет флуоресценции пятен экстракта также изменился на желтый, то это служит подтверждением возможного наличия афлатоксинов в пищевом продукте.

## 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНОВ $B_1$ , $B_2$ , $G_1$ , $G_2$ В МАСЛАХ

### 2.1. ЭКСТРАКЦИЯ

К 15 г масла добавляют 25 мл гексана, 5 мл 4%-го раствора хлорида натрия и 100 мл ацетонитрила. Встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 40-50 минут. Затем смесь помещают в делительную воронку и отделяют нижний ацетонитрильный слой.

### 2.2. ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА.

Ацетонитрильный экстракт обезжиривают в делительной воронке гексаном (3x50мл), высушивают сульфатом натрия и упаривают досуха. Остаток растворяют в "мл хлороформа и проводят очистку с помощью колоночной хроматографии. На колонку с 4 г силикагеля (п. 1.2.) наносят хлороформный экстракт, дают хлороформу

стечь и промывают 100 мл смеси гексан-бензол-эфир (1:1:2). Афлатоксины элюируют 100 мл смеси хлороформ-ацетон (9:1). Элюат упаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный или капроновый фильтр, отдувают растворитель в токе азота, растворяют в 400 мкл хлороформа и анализируют с помощью ВЭЖХ (п. 1.4.).

Расчет концентрации афлатоксина проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times h \times m_{\text{ст.}}}{V_2 \times h_{\text{ст.}} \times M}$$

C - концентрация афлатоксина в масле;

$V_1$  - объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (200 мкл);

$V_2$  - объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл);

$m_{\text{ст}}$  - количество нг афлатоксина во введенном объеме стандарта;

$h_{\text{ст}}$  - высота пика стандарта афлатоксина в мм;

$h$  - высота пика афлатоксина во введенном объеме экстракта в мм;

M - навеска продукта, взятая в г.

Подтверждение наличия афлатоксина с помощью двумерной ТСХ проводят аналогично п. 1.5.

### 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА $M_1$ В МОЛОКЕ

#### 3.1. ЭКСТРАКЦИЯ.

В коническую колбу на 250 мл помещают 50 мл натурального молока или раствор 5 г сухого молока в 50 мл воды, 10 мл водного раствора 2 г хлорида натрия и 0.24 г лимонной кислоты, 120 мл хлороформа (все составные части предварительно подогревают до температуры 35-38°C). Содержимое колбы встряхивают 2-3 минуты, переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют 15 минут при 3000-40000 об/мин. Отделяют нижний хлороформный слой, высушивают над 10 г безводного сульфата натрия, отфильтровывают, измеряют объем фильтрата ( $V_2$ ) и упаривают до 5 мл.

Очистку проводят с помощью колоночной хроматографии. На дно стеклянной колонки помещают кусочек ваты, затем безводный сульфат натрия (толщина слоя 5мм), заливают суспензию 2 г (2 мл) силикагеля в гексане и сверху насыпают слой безводного сульфата натрия. Дают гексану стечь так, чтобы над слоем сульфата натрия осталось около 5 мл гексана. Вносят 5 мл анализируемого экстракта. Дают растворителю стечь и затем колонку последовательно промывают 25 мл смеси толуол-уксусная кислота (9.5:0.5), 25 мл гексана и 25 мл смеси эфир-гексан-ацетонитрил (5:3:1). Афлатоксин  $M_1$  элюируют с колонки 60 мл смеси хлороформ-ацетон (4:1). Элюат упаривают досуха, растворяют в 200 мкл хлороформа и анализируют с помощью ВЭЖХ.

#### 3.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО РАСТВОРА АФЛАТОКСИНА $M_1$

Навеску кристаллического афлатоксина  $M_1$  в 1 мг помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (9:1). Концентрация афлатоксина  $M_1$  в приготовленном стандартном растворе составляет 10 нг/мкл. Для приготовления стандартного раствора афлатоксина  $M_1$  с концентрацией 0.2 нг/мкл в мерную колбу на 50 мл помещают 1 мл стандартного раствора афлатоксина  $M_1$  и доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (9:1).

### 3.3. ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА М<sub>1</sub> С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза эфир-метанол-вода (90:8:2), остальные параметры как в п. 1.4. Чувствительность детектора устанавливается таким образом, чтобы 0.6-0.8 нг афлатоксина М<sub>1</sub> соответствовало отклонению пера на полную шкалу самописца при уровне шума от 3 до 5% от полной шкалы. Для калибровки флуоресцентного детектора в инжектор вводится 1, 2, 3 мкл рабочего раствора афлатоксина М<sub>1</sub>, что соответствует 0.2, 0.4, 0.6 нг афлатоксина М<sub>1</sub>. Для каждого количества афлатоксинов измеряют высоту пика. В приведенных выше условиях ВЭЖХ время удерживания афлатоксина М<sub>1</sub> 8-9 минут.

В инжектор хроматографа вводится с помощью микрошприца 20 мкл раствора очищенного экстракта. При наличии пика, совпадающего по времени с афлатоксином М<sub>1</sub>, определяют его высоту (h). Расчет концентрации афлатоксина М<sub>1</sub> проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times V_3 \times h \times m_{\text{ст.}}}{V_2 \times V_4 \times h_{\text{ст.}} \times M}$$

C - концентрация афлатоксина М<sub>1</sub> в молоке, мкг/кг;

V<sub>1</sub> - объем хлороформа, взятого для экстракции (120 мл);

V<sub>2</sub> - объем хлороформного экстракта, взятого для анализа;

V<sub>3</sub> - объем очищенного экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (200 мкл);

V<sub>4</sub> - объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл);

m<sub>ст.</sub> - количество нг афлатоксина М<sub>1</sub> в введенном объеме стандарта;

h<sub>ст.</sub> - высота пика стандарта афлатоксина в мм;

h - высота пика афлатоксина в введенном объеме экстракта в мм;

M - навеска продукта, взятая в г.

Если пик афлатоксина М<sub>1</sub> в образце выходит за пределы шкалы самописца, анализ с помощью ВЭЖХ проводят повторно, уменьшая объем вводимого в инжектор раствора экстракта (V<sub>4</sub>) или разбавляя раствор экстракта хлороформом (увеличивая объем V<sub>3</sub>).

### 3.4. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НАЛИЧИЯ АФЛАТОКСИНА М<sub>1</sub> С ПОМОЩЬЮ ДВУМЕРНОЙ ТСХ

Очистка и обнаружение афлатоксина М<sub>1</sub>

ТСХ-очистку и обнаружение афлатоксина М<sub>1</sub> проводят с помощью двумерной ТСХ на пластинках "Силуфол" аналогично п.1.5. В качестве растворителей для развития хроматограмм используют в первом направлении смесь эфир-метанол-вода (90:8:2), во втором направлении смесь хлороформ-ацетон-изопропиловый спирт (85:10:5).

Тесты, подтверждающие наличие афлатоксина М<sub>1</sub> в продукте, проводят аналогично п. 1.5.