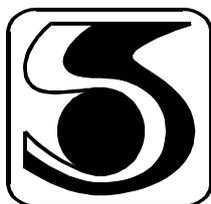


*Научно-технологическая
компания*

СИНТЕКО



МЕТОДИКА

**ПО ОБНАРУЖЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ
АФЛАТОКСИНА В₁ В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.**

Дзержинск 1997г.

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 В₁ и В₂ (синяя флуоресценция в длинноволновом диапазоне УФ свете) и афлатоксины G₁ и G₂ (сине-зеленая флуоресценция). Среди них высокими токсическими свойствами и наиболее широкой распространенностью выделяется афлатоксин В₁.

Биологическая активность афлатоксинов проявляется в виде как острого токсического эффекта, так и отдаленных последствий - канцерогенного, мутагенного и терратогенного 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 В₁ 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 В₁ на уровне 1 мкг/кг (предел чувствительности ТСХ-метода).

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 В₁ - 0.1 мкг/кг (при использовании флуоресцентного детектора) и 1.0 мкг/кг для афлатоксина В₁ (при использовании УФ-детектора). Относительное стандартное отклонение метода составляет 0,1. Степень извлечения афлатоксина В₁ 78-80%. 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 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 чувствительностью 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 Цвет-3110 с флуоресцентным детектором, либо Цвет-3006М со спектрофотометрическим детектором;
6. Колонка хроматографическая 250x2 мм, заполненная сорбентом Сепарон С-18, фракции 5 мкм;
7. Микрошприц на 25 мкл;
8. Стеклянные камеры для ТСХ с притертыми крышками, например, стеклянные четырех угольные сосуды 195x195x200 мм завода “дружная горка”;
9. Пластинки для ТСХ “Силуфол” размером 15x15 или 20x20 см, ЧСФР;
10. Воронки делительные ВД2-250 или ВД2-500, ГОСТ 8613-75;
11. Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 100-250 мкм (силикагель ЧСФР).
12. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 ГОСТ 1770-74;
13. Цилиндры мерные на 250 мл с притертой пробкой, тип 2-250 по гост 1770-74;
14. Колбы плоскодонные конические на 250 и 500 мл с НШ29 тип КнКШ 250-29/32 и КнКШ 500-29/32 по ГОСТ 10394-72;
15. Колбы круглодонные на 1000 мл с НШ29, тип ККШ 250-29/32 по ГОСТ 10394-72;
16. Колбы грушевидные на 50 мл с НШ 14.5, тип ГрКШ 50-14/23 по ГОСТ 10394-72;
17. Воронки химические диаметром 150 мм по ГОСТ 8613-75;
18. Колонка стеклянная хроматографическая 2300x15 мм;
19. Распылитель стеклянный с грушей;
20. Афлатоксин В₁;
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. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709;
28. Кислота лимонная по ГОСТ 3652-29;
29. Кислота азотная концентрированная по ГОСТ 4461-67;
30. Сульфат натрия безводный по ГОСТ 4166-76;
31. Натрий хлористый по ГОСТ 4233-66;
32. Эфир диэтиловый медицинский по ГОСТ 6265-52;
33. Свинец уксуснокислый по ГОСТ 1027-67;
34. Окись алюминия для колоночной хроматографии (нейтральный) 40/250 (ЧСФР).

П р и м е ч а н и е. Измерительные приборы, перечисленные в перечне, могут быть заменены аналогичными, обеспечивающими требуемую точность.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА В₁ 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 фильтрата. Обезжиривают в делительной воронке гексаном (2х30 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 элюента (раствор А) и анализируют с помощью ВЭЖХ.

1.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНЫХ РАСТВОРОВ АФЛАТОКСИНА В₁

1.3.1. Стандартный раствор готовят следующим образом:

Навеску кристаллического афлатоксина В₁ в 1 мг помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки ацетонитрилом. Концентрация афлатоксина в приготовленном стандартном растворе составляет 10 мг/л.

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

1.3.2. Градуировочные растворы для анализа афлатоксина В₁ готовят согласно таблицы 1.

Таблица 1.

№ раствора	Объем стандартного раствора афлатоксина В ₁ , мл	Объем колбы, мл	Концентрация афлатоксина В ₁ в градуировочном растворе, мг/л
1	5	50	1,0
2	2,5	50	0,5
3	1,0	50	0,2
4	0,5	50	0,1
5	0,25	50	0,05
6	0,10	50	0,02
7	0,05	50	0,01

1.4. ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА В₁ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ.

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза ацетонитрил-вода (50:50), скорость подвижной фазы 0.2 мл/мин. 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.

Для калибровки прибора по флуоресцентному детектору в инжектор вводят градуировочные растворы №№ 3-7 начиная с минимальной концентрации V_1 в количестве 50 мкл (объем дозирующей петли хроматографа). Для каждой концентрации афлатоксина определяют высоту пика. В приведенных выше условиях время выхода растворителя составляет 3.0-3.5 минуты, времена удерживания афлатоксинов : для V_1 8.0-9.0 мин, в зависимости от небольших изменений в составе подвижной фазы и времени уравнивания колонки.

При высоких уровнях загрязнения пищевых продуктов афлатоксинами 10 мг/кг рекомендуется использовать также показания УФ-детектора. Калибровку прибора по УФ-детектору проводят вводя в хроматограф градуировочные растворы №№ 1-4 начиная с меньшей концентрации афлатоксина V_1 .

При наличии пика, совпадающего по времени с афлатоксином V_1 определяют его высоту (h). Расчет концентрации афлатоксина проводят по формуле:

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

Где C - концентрация афлатоксина в пищевом продукте в мкг/кг;

V_1 - объем водно-ацетоновой смеси в мл (125 мл);

V_2 - объем водно-ацетонового фильтрата, взятый для анализа в мл (50 мл);

V_3 - объем водно-ацетонового фильтрата и раствора ацетата свинца (100 мл);

V_4 - объем фильтрата после очистке ацетатом свинца (80 мл);

V_5 - объем очищенного раствора экстракта в элюенте перед ВЭЖХ (400 мкл);

$h_{ст.}$ - высота пика стандарта афлатоксина в ед. счета интегратора;

h - высота пика афлатоксина во введенном объеме экстракта в ед. счета интегратора;

M - навеска образца, взятая в г.

$C_{ст.}$ - концентрация афлатоксина V_1 в градуировочном растворе, мг/л.

Если пик афлатоксина выходит за пределы шкалы самописца, анализ с помощью ВЭЖХ, проводят повторно разбавляя раствор экстракта хлороформом (увеличивая объемом 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 градуировочного раствора №2. В левом нижнем углу на расстоянии 1, 2 и 3 см от левого края и 1.5 см от нижнего края пластинки наносят 5 мкл градуировочных растворов №1-3 афлатоксина V_1 . 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) 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 АФЛАТОКСИНА B_1 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 2 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 элюента (ацетонитрил : вода = 50 : 50) и анализируют с помощью ВЭЖХ (п. 1.4.).

Расчет концентрации афлатоксина проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot h}{h_{ст.} \cdot M} \cdot C_{ст.}$$

C - концентрация афлатоксина в масле;

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

$C_{ст.}$ - концентрация афлатоксина B_1 в объеме стандарта, мг/л;

$h_{ст.}$ - высота пика стандарта афлатоксина в ед. счета интегратора;

h - высота пика афлатоксина во введенном объеме экстракта в ед. счета интегратора;

M - навеска продукта, взятая в г.

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