ВСЕСОЮЗНАЯ АКАДЕМИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
имени В. И. ЛЕНИНА

Отделение ветеринарии

Методические рекомендации по исследованию кормов на содержание охратоксинов

Москва—1980

gost.e-ecolog.ru

Всесоюзная академия
сельскохозяйственных наук
имени В.И.Ленина

Отделение ветеринарии

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ КОРМОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ОХРАТОКСИНОВ

Утверждаю:
Академик-секретарь
Отделения ветеринарии
академик ВАСХНИЛ В.П.Шишков
4 августа 1980 г.

Москва – 1980

Методические рекомендации разработаны Всесоюзным научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии (А.Н.Леонов) и утверждены на заседании секции "Зоогигиена, ветеринарная санитария и охрана окружающей среды" Отделения ветеринарии ВАСХНИЛ 20 февраля 1980 г.

Методические рекомендации предназначены для научно-исследовательских ветеринарных учреждений, занимающихся вопросами санитарии кормов.

Ответственный за выпуск - ученый секретарь Отделения ветеринарии ВАСХНИЛ кандидат ветеринарных наук К.П.Семенов.

© Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук имени В.И.Ленина

Охратоксины – метаболиты многих плесеней, возникающих при хранении, – являются причиной микотоксической нефропатии свиней, характеризующейся симптомами полидипсии и полиурии. Известны также случаи отравления охратоксинами кур и индюк.

Ущерб, причиняемый охратоксинами животноводству, достаточно велик, так как многие виды грибов, способные образовывать эти вещества, присутствуют в хранящемся фураже постоянно. Статистические данные о распространенности повышенных концентраций охратоксинов в кормах в нашей стране отсутствуют, так как соответствующие исследования должным образом не ведутся.

Применяемые в практике упрощенные методы токсикологической оценки кормов, такие, как биопроба на коже кролика или рыбах гуппи, не позволяют установить наличие охратоксинов. Косвенным показателем может явиться выделение в повышенных количествах одного из известных продуцентов охратоксинов при серийных микологических исследованиях кормов. Продуцентами охратоксинов являются грибы, относящиеся к видам Penicillium purpurrescens Sopp, P. commune Thom, P. viridecatum Westl.; P palitans Westl; P. cyclopium Westl; P. variabile Sopp; P. verruculosum Peyronel; Aspergillus sulphureus (Fres.) Thom and Church; A. selerotorum Huber, A. alliaceus Thom and Church; A. melleus Yukawa; A. ochruceus Wilhelm; A. ostianus Wehmer; A. petrakii Noros. Этот показатель относителен, так как не все разновидности потенциальных продуцентов способны образовывать охратоксины, и происходит это далеко не всегда, даже если гриб получил на кормах достаточное развитие.

Химико-аналитическое исследование кормов на содержание охратоксинов необходимо как с диагностической, так и с профилактической целью.

В первом случае необходимость исследования обусловлена *симптоматическим комплексом, позволяющим предположить микотоксическую нефропатию.* Методически наиболее правильным является исследование подозреваемых кормов, которые использовались в течение месяца, предшествующего возникновению заболевания.

Показанием к организации профилактических исследований должен служить факт поражения кормов одним из видов грибов, перечисленных выше. Из зернофуража, подверженного поражению такими грибами, наиболее благоприятным для накопления охратоксинов субстратом следует считать ячмень, овес, кукурузу (как зерно, так и в початках) и в меньшей степени - пшеницу. Токсинообразование особенно усиливается при повышенной влажности субстрата, и этот процесс носит очаговый характер, что должно учитываться при отборе проб для анализа.

Исследование отобранных образцов может быть проведено с помощью одной из следующих методик.

МЕТОДИКА ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНОВ В ЗЕРНЕ И КОМБИКОРМАХ

Принцип метода

Метод основан на извлечении охратоксинов подкисленным хлороформом из измельченной пробы. Экстракт очищают на колонке с диатомитом, элюируют очищенную фракцию из колонки специфической системой растворителей. Полученный полуочищенный экстракт разделяют в тонком слое силикагеля в присутствии вещества-свидетеля с последующей идентификацией анализируемых веществ по фактору удерживания (R_f) и характеру флюоресценции в ультрафиолетовой части спектра. Чувствительность определения - не менее 40 мкг/кг исследуемого образца.

Оборудование, реактивы и растворы[x]

Шуттель-аппарат; баня водяная или песочная; источник УФ-света (хроматоскоп, ШИ-I или другой прибор с аналогичной характеристикой излучения); хроматографическая камера; колонки хроматографические (2 х 70 см); пластинки для хроматографии типа Силуфол; диатомит марки Целит-545; фосфорная кислота; муравьиная кислота 85%-ная; уксусная кислота ледяная; хлороформ;

---

[x] Все реактивы должны соответствовать квалификации х.ч. или ч.д.а. в соответствии с требованиями действующих ГОСТов.

гексан; бензол; метанол; спирт этиловый; раствор двууглекислого натрия, водный, 1,25%-ный; смесь хлороформа с муравьиной кислотой (99:1), свежеприготовленная; стандартный раствор охратоксина А, 1-5 мкг/мл.

Ход анализа

Экстракция пробы и очистка экстракта. К 50 г тщательно измельченной и перемешанной пробы, помещенной в колбу Эрленмейера объемом 500 мл, прибавляют 25 мл 0,1 М раствора фосфорной кислоты и 250 мл хлороформа, экстрагируют при встряхивании на шуттель-аппарате в течение получаса и фильтруют через воронку Бюхнера, содержащую 10 г диатомита. Первые 50 мл полученного экстракта смешивают с 40 мл гексана и вносят в хроматографическую колонку, содержащую 2 г диатомита, внесенного с помощью 1 мл водного раствора двууглекислого натрия. Колонку элюируют при максимальной скорости вытекания и промывают 75 мл хлороформа. Полученный элюат сохраняют для возможного дальнейшего исследования на содержание эфиров охратоксинов с помощью газохроматографического метода (при отсутствии подобной возможности элюат отбрасывают).

Извлечение охратоксинсодержащей фракции из колонки. Колонку промывают 75 мл свежеприготовленной смеси хлороформа с муравьиной кислотой (99:1), давая стечь растворителю с максимальной скоростью. Элюат быстро выпаривают на водяной бане (для предотвращения бурного кипения добавляют стеклянные бусы), и остаток переносят с помощью небольшого количества хлороформа в коническую центрифужную пробирку. Полученный раствор выпаривают, а остаток растворяют в 750 мкл бензола, содержащего 1% уксусной кислоты. Этот раствор используют для дальнейшего определения вещества в тонком слое силикагеля.

Хроматографическое разделение в тонком слое. На стартовую линию пластинки наносят ряд проб объемом 3, 5, 7,5 и дважды по 10 мкл раствора исследуемого вещества. В одну из нанесенных проб объемом 10 мкл прибавляют 10 мкл стандартного раствора охратоксина А (внутренний стандарт). Стандартный раствор наносят также в виде отдельных проб объемами 5, 7,5 и

10 мкл (для нанесения проб на пластинки рекомендуется пользоваться микрошприцем для газовой хроматографии объемом 10 мкл).

Пластинку помещают в ненасыщенную камеру, содержащую смесь бензол-метанол-уксусная кислота (18:1:1), и разделяют до момента подъема фронта растворителя на максимальную высоту. После этого пластинку извлекают, подсушивают на воздухе до исчезновения запаха смеси растворителей и просматривают в темноте под длинноволновым УФ-светом. Охратоксины А и В имеют показатель фактора удерживания (R_f) в диапазоне 0,4-0,8. Охратоксин А более интенсивно флюоресцирует под воздействием длинноволновой области спектра (365 нм), создаваемого МИТ-1, охратоксин В - в коротковолновой области спектра (254 нм), создаваемого хроматоскопом.

Оценка результатов и дополнительное проявление

При обнаружении в исследуемом экстракте веществ, идентичных стандарту по R_f и характеру флюоресценции, визуально сравнивают интенсивность флюоресценции в пробах исследуемого и стандартного вещества. В случае несоответствия интенсивности свечения стандарта и пробы анализируемый раствор может быть сконцентрирован или разбавлен и процесс хроматографирования повторяют на новой пластинке, с тем чтобы получить сопоставимую интенсивность свечения. Это позволяет ориентировочно определить концентрацию вещества в исследуемом растворе в мкг/мл. При пересчете на концентрацию в исследуемом корме все вещество, находящееся в элюате из колонки, следует принимать за количество, аликвотное 10 г исследуемого материала, или 20%.

Для уточнения полученных результатов и подтверждения, что обнаруженное вещество действительно является охратоксином, пластинку можно опрыснуть спиртовым раствором двууглекислого натрия (6 г $NaHCO_3$ + 100 мл воды + 20 мл этанола). Интенсивность флюоресценции обнаруженного и стандартного вещества при просмотре пластинки в длинноволновом УФ-свете должна возрасти, а ее оттенок сместиться в сторону голубого. Ориентировочную оценку концентрации обнаруженного вещества повторяют. При несоответствии первой и второй оценок правильной следует признавать первую оценку.

МЕТОДИКА ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ОХРАТОКСИНОВ

Принцип методики

Метод основан на извлечении охратоксинов из пробы и фракционировании природных эфиров охратоксинов от охратоксинов, обладающих свойствами кислот. Экстракт разделяют на колонке, заполненной диатомитом, повторно очищают фракцию, содержащую эфиры охратоксинов, методом осадочной хроматографии на второй колонке с диатомитом. Пробу очищенного экстракта разделяют на хроматографе. Это позволяет дифференцированно обнаруживать биологически активные (токсичные) и биологически неактивные (нетоксичные) формы природных эфиров охратоксинов и проводить их количественное определение в пробе.

Чувствительность метода при введении в колонку хроматографа минимальных объемов экстракта (1 мкл) составляет не менее 20 нг/мкл, или 250 мкг/кг корма. При введении в испаритель прибора оптимального объема (5 мкл) метод позволяет определять вещество на уровне рекомендуемых предельно допустимых концентраций (ПДК) – 50 мкг/кг.

Оборудование и посуда

Газовый хроматограф Газохром 1106 с со стеклянной колонкой 0,3 х 50 см, заполненной метилсилоксаном SE-30 (5% на хроматоне); спектрофотометр СФ-16 (СФ-26) или аналогичный прибор; шуттель-аппарат; баня водяная или песочная; колонки хроматографические (2 х 70 см); лабораторная посуда.

Реактивы и растворы[x/]

Хлороформ; бензол; гексан; метанол; кислота уксусная ледяная; кислота фосфорная; кислота муравьиная 85%-ная; натрий двууглекислый; диатомит марки Целит-545 (перед работой следует прокалить при 150° в течение 8–12 ч); раствор двууглекислого натрия водный, 1,25%-ный; раствор двууглекислого натрия водно-метанольный (0,3 г $NaHCO_3$ в 30 мл H_2O + 70 мл метанола).

---

x/ Все реактивы должны соответствовать квалификации х.ч. или ч.д.а. в соответствии с требованиями действующих гостов.

Стандартные растворы этиловых эфиров охратоксинов А и В или их смеси (30–50 мкг/мл) в хроматографически чистом ацетоне или гексане. При необходимости концентрацию уточняют, измеряя оптическую плотность вещества в бензоле, содержащем 1% уксусной кислоты (λ_{max} - 333 нм, МВ - 431, ε - 6200 и λ_{max} - 320 нм, МВ - 397, ε - 6500).

Смесь бензол-гексан-муравьиная кислота. Приготовление: смешать в делительной воронке бензол с гексаном (2:8) и прилить к полученной смеси десятую часть 70%-ного водного метанола. Дождаться разделения фаз и отбросить нижнюю, а к верхней прибавить 86%-ную кислоту в количестве, составляющем 5% от объема первой смеси. Разделить и отбросить нижний слой.

Ход анализа

Извлечение вещества из пробы и его очистка. Измельченный высушенный корм (50 г) помещают в колбу объемом 0,5 л, приливают 25 мл 0,1 М раствора фосфорной кислоты и 250 мл хлороформа. Экстрагируют при интенсивном перемешивании (шуттель-аппарат) в течение 30 мин. Экстракт отфильтровывают через стеклянный фильтр с 10 г диатомита Целит-545. 50 мл фильтрата смешивают с 40 мл гексана и вносят в хроматографическую колонку, содержащую 2 г диатомита и 1 мл 1,25%-ного раствора двууглекислого натрия. Колонку элюируют при максимальной скорости вытекания смеси и промывают 75 мл хлороформа. Объединенный элюат, полученный из колонки, выпаривают. Остаток с помощью 50 мл гексана переносят во вторую колонку с 4 г диатомита и 2,5 мл водно-метанолового раствора двууглекислого натрия. Быстро сливают внесенный раствор и промывают колонку 50 мл смеси бензол-гексан (1:9), уравновешенной 2,5 мл водно-метанолового раствора двууглекислого натрия. Элюат отбрасывают и колонку промывают смесью (100 мл) бензол-гексан-муравьиная кислота. Вновь полученный элюат немедленно выпаривают. Остаток переносят в пробирку с притертой пробкой с помощью небольших количеств хлороформа, излишек растворителя выпаривают в токе азота до исчезновения запаха, а остаток перераспределяют в 1 мл хроматографически чистого ацетона или гексана. Полученный раствор (V_2) используют для ввода в хроматограф.

Разделение, идентификация и количественное определение охратоксинов на хроматографе. Устанавливают следующий режим работы прибора: температура термостата колонки – 220°, термостата детектора – 240-250°, испарителя – 235°. Соотношение расхода газа-носителя и газа, подаваемого в камеру детектора, – 40-60 мл/мин. Вводят в испаритель пробу стандартного раствора, объемом 1-5 мкл (в зависимости от выбранного для работы масштаба усиления электрометра). Определяют время удерживания охратоксинов, которое при вышеуказанном режиме должно составлять для эфира охратоксина В (нетоксичного) около 10 мин, а для эфира охратоксина А (токсичного) – около 14-14,5 мин.

Вводят в испаритель прибора ряд проб исследуемого раствора тех же объемов и определяют среднее значение высот пиков, имеющих то же время удерживания, что и стандарт. По трем повторным результатам рассчитывают среднее значение высоты пика стандартного вещества (H_1) и вещества в определяемой пробе (H_2).

Концентрацию определяемого вещества в исследуемом продукте (X) рассчитывают по следующей формуле, принимая V_3 за 0,2 от величины навески, взятой для анализа:

$$X = \frac{1{,}25 \cdot A \cdot H_2 \cdot V_2}{H_1 \cdot V_1 \cdot V_3},$$

где X – концентрация вещества в исследуемой пробе (мг/л, мг/кг);

A – количество вещества в стандартном растворе, введенном в хроматограф (мкг);

H_1 – высота пика стандартного вещества (мм);

H_2 – высота пика определяемого вещества (мм);

V_3 – количество анализируемой пробы (мл, г);

V_1 – объем экстракта, введенный в испаритель хроматографа (мкл);

V_2 – общий объем экстракта после его упаривания (мл);

1,25 – коэффициент учета потери вещества при экстракции и очистке экстракта на колонках.

Заключение по результатам анализа

При обнаружении охратоксинов в кормах необходимо принять меры к рациональному использованию неблагополучных партий кормов, руководствуясь следующими положениями.

Верхним пределом допустимых концентраций охратоксинов в кормах (исключая предубойный период) следует считать 100 мкг в 1 кг корма для жвачных и 50 мкг/кг для свиней и птиц.

При выявлении партий зернового сырья, средняя концентрация охратоксинов в которых превышает 3–4 мг/кг, их не следует использовать для изготовления комбикормов. Такое сырье должно быть направлено на техническую утилизацию, так как повторная сушка или термическая обработка при существующих технологических режимах не обеспечивают удовлетворительного снижения концентрации токсина.

Корма для свиней и птиц, содержащие любые концентрации охратоксинов, следует категорически запрещать скармливать в десятидневный период, предшествующий убою животных.

С О Д Е Р Ж А Н И Е

МЕТОДИКА ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОХРАТОКСИНОВ В ЗЕРНЕ И КОМБИКОРМАХ 4

Принцип метода 4

Оборудование, реактивы и растворы 4

Ход анализа 5

Оценка результатов и дополнительное проявление 6

МЕТОДИКА ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ОХРАТОКСИНОВ 7

Принцип методики 7

Оборудование и посуда 7

Реактивы и растворы 7

Ход анализа 8

Заключение по результатам анализа 10

Технический редактор А.Г.Барышникова

Л 53299 от 29.08.1980 г. Формат 60 х 84 1/16
Тираж 500 экз. Печ.л. 0,75 Заказ 3604 Бесплатно

Москва. Типография ВАСХНИЛ

gost.e-ecolog.ru