Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Сборник инструкций 4.1.10-15-61-2005 – 4.1.10-15-63-2005 ОБНАРУЖЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Минск – 2005

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Главного государственного
санитарного врача
Республики Беларусь
от 21 ноября 2005 № 182

Сборник инструкций 4.1.10-15-61-2005 – 4.1.10-15-63-2005 «ОБНАРУЖЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКОТОКСИНОВ В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ»

Введение

В настоящем Сборнике инструкций представлены три Инструкции: Инструкция 4.1.10-15-61-2005 «Обнаружение, идентификация и определение содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах», Инструкция 4.1.10-15-62-2005 «Обнаружение, идентификация и определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах», Инструкция 4.1.10-15-63-2005 «Обнаружение, идентификация и определение Т-2 токсина в продовольственном сырье и пищевых продуктах». Методики, изложенные в настоящем Сборнике инструкций, основаны на современных хроматографических методах анализа: тонкослойной, газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Данные методики высокочувствительны и селективны, позволяют определять микотоксины ниже допустимых уровней.

Инструкции, включенные в настоящий Сборник, разработаны в соответствии с требованиями ГОСТа 8.563—97 «Методики выполнения измерений», ТКП 1.5-2004 (04100) «Система технического нормирования и стандартизации Республики Беларусь. Правила построения, оформления и содержания технических кодексов установившейся практики и государственных стандартов», МИ 2336—95 «Характеристики погрешности результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания», МИ 2335—95 «Внутренний контроль качества результатов».

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Главного государственного
санитарного врача
Республики Беларусь
от 21 ноября 2005 № 182

Инструкция 4.1.10-15-61-2005 «ОБНАРУЖЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА (ВОМИТОКСИНА) И ЗЕАРАЛЕНОНА В ЗЕРНЕ И ЗЕРНОПРОДУКТАХ»

1. Общие сведения

Настоящая Инструкция предназначена для научно-исследовательских организаций, производственных лабораторий, органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор и других заинтересованных организаций.

Настоящая Инструкция разработана с целью обеспечения контроля за загрязнением зерна и зернопродуктов фузариотоксинами: дезоксиниваленолом (вомитоксином) и зеараленоном.

Дезоксиниваленол и зеараленон являются микотоксинами, наиболее часто продуцируемыми широко распространенными микроскопическими грибами рода Fusarium/(Fusarium graminearum, F.cuimorum, F.roseum и др.), поражающими зерновые.

Дезоксиниваленол (вомитоксин)- 3,7,15-тригидрокси-12,13-эпокси-трихотец-9-ен 8-он относится к группе трихотеценовых микотоксинов, вызывающих тяжелые алиментарные микотоксикозы у животных, которые характеризуются геморрагическим синдромом отказом от корма, рвотой, поражением кроветворных и иммунокомпетентных органов.

Дезоксиниваленол - бесцветное кристаллическое вещество с молекулярной массой 296 атомных единиц масс (далее – а.е.м.), имеет слабо выраженный максимум поглощения ультра-фиолетового света (далее - УФ-свет) при длин волны 219 нм (е 4500 в метаноле), не обладает флуоресценцией. Температура плавления 151-153°С. Дезоксиниваленол хорошо растворим в воде, спиртах, ацетонитриле этилацетате, нерастворим в гексане и бензоле. Обнаружение дезоксиниваленола при тонкослойной хроматографии (далее - ТСХ) производят по специфической флуоресценции после обработки раствором хлорида алюминия.

Зеараленон - лактон 6-(10-окси-6-кето-транс-1-ундеценил)-b-резорциловой кислоты (F-2-токсин), обладает выраженным эстрогенным действием на большинство видов сельскохозяйственных животных, а также на приматов, вызывая нарушения функций воспроизводства.

Установлен допустимый уровень содержания зеараленона в зерновых - 1 мг/кг.

Зеараленон - бесцветное кристаллическое вещество, плохо растворим в воде и гексане, хорошо растворим в низших спиртах, ацетонитриле, ацетоне, бензоле, с молекулярной массой 318 а.е.м. и максимумами поглощения в УФ-спектре (в этаноле) при 236 нм

(е 29700), 274 нм (е 13909) и 316 нм (е 6020). Зеараленон обладает сине-голубой флуоресценцией низкой интенсивности при возбуждении длинноволновым (360 нм) УФ-светом, которая повышается при возбуждении коротковолновым УФ-светом (254 нм). Интенсивность флуоресценции усиливается после обработки зеараленона раствором хлористого алюминия в этиловом спирте. Более высокая чувствительность обнаружения зеараленона при ТСХ достигается при использовании реакции азосочетания с растворами стабильных диазониевых солей: прочной синей В-соли или прочной фиолетовой В-соли, в результате которой образуется интенсивно окрашенные продукты.

2. Принцип метода

Предлагаемый метод определения дезоксиниваленола и зеараленона в одном образце зерна и зернопродуктов включает следующие этапы:

экстракцию дезоксиниваленола и зеараленона из образца смесью ацетонитрил-вода (84:16);

очистку одной части экстракта на колонке со смесью угля с оксидом алюминия;

определение дезоксиниваленола в очищенном экстракте с помощью ТСХ с флуориметрическим обнаружением после обработки пластинок хлоридом алюминия и с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее - ВЭЖХ) на силикагеле с ультрафиолетовым детектором (далее УФ-детектор) при длине волны 224 нм;

обезжиривание второй части экстракта гексаном;

разбавление экстракта водой и переэкстракция зеараленона в бензол;

определение зеараленона с помощью одномерной или двумерной ТСХ с флуориметрическим обнаружением после обработки пластинок хлоридом алюминия или с помощью нормальнофазовой ВЭЖХ с УФ-детектором при длине волны 283 нм или флуориметрическим детектором (длина волны возбуждающего света 283 нм, эмиссионного света - от 420 нм).

Продолжительность анализа 3,5 – 4 часа.

Предел обнаружения метода:

для дезоксиниваленола - 0,2 мг/кг (по ТСХ); 0,05 мг/кг (по ВЭЖХ);

для зеараленона - 0,1 мг/кг (по ТСХ); 0,005 мг/кг (по ВЭЖХ).

Относительное стандартное отклонение:

для дезоксиниваленола - 0,25-0,30 (по ТСХ); 0,05-0,09 (по ВЭЖХ);

для зеараленона - 0,40-0,60 (по ТСХ); 0,06-0,09 (по ВЭЖХ).

Степень извлечения добавленных в пробу фузариотоксинов составляет 80-85% для дезоксиниваленола и 85-90% для зеараленона.

3. Средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы

При выполнении измерений должны применяться следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы:

Средства измерений	
Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) или диагностическая лампа ОЛД-41 или «Люминоскоп» ЛПК-1	
Жидкостной хроматограф с УФ-детектором с переменной длиной волны (для анализа зеараленона возможно также использование флуориметрического детектора) колонка и предколонка с силикагелем с размером частиц 5 мкм, длина колонки - 2 см, предколонки - 4,5 см, внутренний диаметр - 4,6 мм	
Микрошприцы МШ-10 на 10 мкл, микрошприцы на 10 или 25 мкл для ВЭЖХ	
Стеклянные камеры для ТСХ с притертыми крышками	
Пластинки для ТСХ «Silufol» (Чехия) или «Sorbfil» (Россия) размером 15х15 см или 20х20 см	
Вспомогательное оборудование	
Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С или аналогичный	
Ротационный испаритель ИР-1М с ловушкой или аналогичный испаритель	
Мельница лабораторная электрическая ЭМ-3А или аналогичная	
Распылитель стеклянный с грушей	
Колбы конические плоскодонные на 250 мл, НШ 29, тип КнКШ 250-29/32	ГОСТ 25336-82
Колбы грушевидные на 100 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23	
Колбы грушевидные на 10-20 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23	
Колбы мерные на 100 мл, тип 2-100-2	ГОСТ 1770-74
Воронки делительные ВД2-250	ГОСТ 25336-82
Колонка стеклянная хроматографическая 220х15 мм	

Реактивы

Стандартные растворы дезоксиниваленола в этилацетате с концентрацией 25 нг/мкл каждый, стандартный раствор зеараленона в бензоле с концентрацией 10 нг/мкл	
Ацетонитрил, чистый (далее - ч.)	
Ацетон, чистый для анализа (далее – ч.д.а.)	ГОСТ 2603-79
Бензол, ч.д.а.	ГОСТ 5955-75
Гексан, ч. или ч.д.а.	
Изопропиловый спирт (пропанол-2), химический чистый (далее – х.ч.)	
Кислота уксусная, ч.д.а.	ГОСТ 61-75
Кислота муравьиная, ч.	ГОСТ 5848-73
Метанол, ч.д.а.	ГОСТ 6995-77
Толуол, ч.д.а.	ГОСТ 5789-78
Хлороформ х.ч.	
Этиловый спирт ректификованный из пищевого сырья	СТБ 1334-2003
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), ч.д.а.	ГОСТ 22300-76
Эфир диэтиловый технический	ТУ 7506804-92-90
Эфир петролейный (температура кипения 40-70°С)	ТУ 6-02-1244-83
Алюминий оксид нейтральный для хроматографии по Брокману, «Реанал»,(Венгрия) N 01125 или алюминий оксид для хроматографии	
Алюминий хлористый, 6-водный, ч.д.а.	ГОСТ 3759-75
Натрий сернокислый, безводный, ч.д.а.	ГОСТ 4166-76
Натрий кислый углекислый, ч.д.а.	ГОСТ 83-79
Натрий хлористый, особой степени чистоты	
Диазоневая соль: прочный синий В-соль (диазоль синий С) или прочный фиолетовый В-соль для гистологии, «Хемапол», Чехия	
Уголь активированный Р.72.270.3	

Могут быть использованы другие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы по техническим и метрологическим характеристикам не уступающие указанным в настоящей Инструкции, не влияющие на результат измерения.

4. Требования безопасности

Проведение измерений должно выполняться согласно требованиям правил безопасной работы в химических лабораториях и инструкций по эксплуатации приборов.

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, медицинское или техническое, прошедшие обучение работе на хроматографе, изучившие правила безопасной работы в химических лабораториях и настоящую Инструкцию.

6. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150–69 «Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для разных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды» должны быть соблюдены следующие условия:

температура воздуха (20±5)°С;

атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);

влажность воздуха не более 80% при температуре 25°С.

Выполнение измерений на хроматографе проводят в условиях, рекомендуемых технической документацией по прибору.

7. Экстракция

При отборе пробы для анализа следует руководствоваться требованиями ГОСТа 13586.3-83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб». Отобранную пробу измельчают в течение 1-2 минут в лабораторной мельнице или кофемолке. Навеску 25 г измельченного зерна или муки помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, добавляют 20 мл воды и затем 105 мл ацетонитрила. Встряхивают на аппарате для встряхивания проб в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр. Отбирают 25 мл фильтрата для анализа на дезоксиниваленол и 50 мл фильтрата для анализа на зеараленон.

8. Обнаружение, идентификация и определение содержания дезоксиниваленола в экстракте

Очистка экстракта

В стеклянную хроматографическую колонку на дно помещают кусочек ваты, насыпают 0,75 г порошка активированного угля и сверху - слой 0,75 г оксида алюминия. Над слоем оксида алюминия помещают кусочек ваты. Осторожно помещают в колонку 25 мл экстракта, соответствующие 5г исходного образца (при анализе кукурузы наливают 15 мл экстракта, соответствующие 3 г исходного образца). Отбирают элюат и, не давая колонке просохнуть, добавляют 10 мл смеси ацетонитрил-вода (84:16). Объединенные элюаты фильтруют через бумажный складчатый

фильтр в грушевидную колбу на 50 мл, бумажный фильтр промывают 5-10 мл изопропилового спирта в ту же колбу и фильтрат упаривают на ротационном испарителе до объема 5-7 мл. Добавляют около 20 мл изопропилового спирта и повторно упаривают на ротационном испарителе досуха. Остаток в колбе после упаривания не должен содержать капель воды. Остаток растворяют в 200 мкл этилацетата и плотно закрывают стеклянной пробкой - (раствор А).

Обнаружение и количественное определение дезоксиниваленола с помощью одномерной ТСХ

На пластинке «Silufol» или «Sorbfil» проводят тонкую карандашную линию в 1,5-2 см от нижнего края пластинки. На эту линию на расстоянии 2 см друг от друга с помощью микрошприца наносят 2, 5. 10 и 20 мкл раствора А. Между пятнами экстракта на расстоянии 1 см от них на ту же линию наносят 2, 4, 6 мкл стандартного раствора дезоксиниваленола (50, 100 и 150 нг дезоксиниваленола).Пластинку помещают в камеру для ТСХ и элюируют в системе гексан-ацетон (3:2) на расстоянии 15 см. Пластинку извлекают из камеры, сушат на воздухе 3-4 минуты и опрыскивают 10%-ным раствором хлористого алюминия в этаноле. Пластинку нагревают в сушильном шкафу в течение 5-7 минут при 105°С, затем рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Дезоксиниваленол проявляется в виде пятен с синей флуоресценцией с Rf 0,25-0,30 при использовании пластинки «Silufol». При использовании пластинок «Sorbfil» Rf проявление дезоксиниваленона устанавливают экспериментально, хроматографируя стандартные растворы этого токсина. Наличие в экстракте пятен, соответствующих по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности стандарту дезоксиниваленола, свидетельствует о возможном наличии этого токсина в образце.

Для количественного определения сравнивают интенсивность флуоресценции разных количеств стандартов дезоксиниваленола с интенсивностью флуоресценции их пятен в образце, визуально оценивая количество нг токсинов в нанесенных на пластинку объемах раствора А. Концентрацию дезоксиниваленола в образце рассчитывают по формуле

$$C = \frac{V1 \times m}{V2 \times M \times 1000}$$, где

V1 – объем раствора А в мкл (200 мкл);

V2 - объем раствора А, нанесенный на пластинку в мкл;

m - масса дезоксиниваленола (в нг) в V2 мкл раствора А, оцененная визуальным сравнением со стандартом на ТСХ-пластинке;

М - аликвотная навеска образца, соответствующая раствору А (5 г для пшеницы, 3 г для кукурузы).

Если интенсивность флуоресценции пятна дезоксиниваленола в экстракте выше интенсивности флуоресценции пятна дезоксиниваленола

соответствующего 6 мкл стандартного раствора, то следует разбавить раствор А этилацетатом, т.е. увеличить объем V1, внеся соответствующие коррективы в расчетную формулу.

Окончательное заключение о наличии и уровне загрязнения образца дезоксиниваленолом принимается только на основе данных двумерной ТСХ.

Подтверждение наличия и количественное определение дезоксиниваленола с помощью двумерной ТСХ

Пластинку «Silufol» или «Sorbfil» размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слоя силикагеля, согласно рисунку 1 в приложении 1 настоящей Инструкции. В правом нижнем углу на расстоянии 12 мм от краев пластинки наносят с помощью микрошприца 20 мкл раствора А. В левом нижнем углу пластинки наносят 2, 4 и 6 мкл стандартного раствора дезоксиниваленола, 2 и 5 мкл раствора А. В верхнем правом углу пластинки наносят 2, 4 и 6 мкл стандартного раствора дезоксиниваленола, 10 и 20 мкл раствора А согласно приложению 1 к настоящей Инструкции. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью гексан-ацетон (3:2) и элюируют ее в первом направлении до достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 4 см от верхнего края, пластинку извлекают из камеры и сушат на воздухе. Затем проводят элюирование пластинки во 2-ом направлении смесью эфир-гексан-изопропиловый спирт-вода (77:18:4,5:0,5). После достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 4,5 см от верхнего края пластинки, ее извлекают из камеры и сушат на воздухе. Обнаружение и количественное определение проводят как и при одномерной ТСХ.

Обнаружение и количественное определение дезоксиниваленола с помощью ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза гексан-изопропанол-вода (85:25:1,5), скорость подвижной фазы 1,0 мл/мин. Рекомендуется использовать перегнанные растворители, фильтруя их через бумажный складчатый фильтр перед использованием. УФ-детектор устанавливается на длину волны 224 нм, шкала чувствительности 0,005. При использовании для записи хроматограмм самописца его входное напряжение 10 мВ.

Для калибровки прибора в инжектор с помощью микрошприца вводят по 2 и 4 мкл стандартных растворов, что соответствует 50 и 100 нг дезоксиниваленола. Для каждого количества стандарта определяют высоту пика на хроматограмме. При описанных выше условиях ВЭЖХ время удерживания пика дезоксиниваленола составляет от 5 до 6 минут в зависимости от изменений в составе подвижной фазы.

В инжектор хроматографа вводят 10 мкл раствора А. При наличии пика, совпадающего по времени удерживания с каким-либо стандартом, определяют его высоту ($h_{обр.}$). Расчет концентрации дезоксиниваленола в образце проводят по формуле:

$$C = \frac{V1 \times m \times h_{обр}}{V2 \times M \times 1000 \times h_{ст}}$$, где

V1 – объем раствора А в мкл (200 мкл);
V2 - объем раствора А, внесенный в хроматограф, в мкл (10 мкл);
m - масса стандарта дезоксиниваленола введенная в хроматограф, в нг;
M - аликвотная навеска образца, соответствующая раствору А (5 г для пшеницы,3 г для кукурузы);
$h_{обр}$ – высота пика, соответствующая данной массе стандарта, в мм;
$h_{ст}$ - высота пика дезоксиниваленола из образца, в мм.

Если при использовании самописца для записи хроматограмм пик дезоксиниваленола в образце выходит за пределы шкалы самописца, анализ проводят повторно после разбавления раствора А этилацетатом, т.е. после увеличения объема V1.

9. Обнаружение, идентификация и определение содержания зеараленона

Очистка экстракта

В делительную воронку на 500 мл помещают 50 мл фильтрата, добавляют 50 мл гексана (или гептана), насыщенного ацетонитрилом (гексан, насыщенный ацетонитрилом готовят следующим образом: в делительную воронку на 500 мл помещают 200 мл гексана и 30 мл ацетонитрила, интенсивно встряхивают и после расслоения жидкостей отделяют верхний слой, содержащий гексан). Встряхивают, после разделения слоев отбрасывают верхний гексановый слой. Нижний ацетонитрильный слой дважды встряхивают с 30 мл гексана, насыщенного ацетонитрилом, каждый раз отбрасывая верхний гексановый слой. К обезжиренному ацетонитрильному экстракту в делительной воронке добавляют 100 мл дистиллированной воды и 50 мл бензола. Встряхивают и после разделения слоев отделяют верхний бензольный слой. Если полного расслоения жидкостей не происходит, добавляют 10 мл насыщенного раствора хлорида натрия и смесь еще раз слегка встряхивают. Водный слой экстрагируют еще дважды 30 мл бензола, бензольные слои объединяют и сушат безводным сульфатом натрия. После фильтрования бензольный экстракт упаривают в грушевидной колбе на 100 мл на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 45° С. Сульфат натрия промывают 10 мл бензола в ту же грушевидную колбу и упаривают раствор досуха. Остаток растворяют в 500 мкл бензола - раствор В.

Обнаружение и идентификация зеараленона с помощью одномерной ТСХ

На пластинке «Silufol» или «Sorbfil» проводят тонкую карандашную линию на расстоянии 1,5 – 2 см от нижнего края пластинки. На эту линию на расстоянии 2 см друг от друга наносят с помощью микрошприца 5 и 10

мкл раствора В. Между пятнами экстракта на расстоянии 1 см от .них на ту же линию наносят 5, 10 и 20 мкл стандартного раствора зеараленона (50, 100 и 200 нг зеараленона соответственно). Аналогично готовят вторую пластинку «Silufol» или «Sorbfil». Обе пластинки помещают в камеру для ТСХ и элюируют в системе гексан-ацетон (7:3). Пластинки извлекают и сушат на воздухе 3-4 минуты.

Для обнаружения пятен зеараленона на 1-ой пластинке используют опрыскивание 10%-ным раствором хлорида алюминия в этиловом спирте с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100-105°С в течение 10 минут. Обнаружение на пластинке пятен, соответствующих по цвету флуоресценции (синий) и хроматографической подвижности пятнам стандартов зеараленона, свидетельствует о возможном наличии зеараленона в образце.

Для подтверждения наличия зеараленона 2-ую ТСХ-пластинку опрыскивают 1%-ным раствором прочной синей В-соли или прочной фиолетовой В-соли в дистиллированной воде, затем пластинку немедленно опрыскивают 5%-ным раствором углекислого натрия до появления красно-бордовой окраски пятен стандарта зеараленона. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цвету и хроматографической подвижности стандартам зеараленона, подтверждает наличие зеараленона в образце.

Количественное определение зеараленона с помощью двумерной ТСХ согласно приложению 2 к настоящей Инструкции

Пластинку «Silufol» или «Sorbfil» размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слоя силикагеля. В правом нижнем углу на расстоянии 12 мм от краев пластинки наносят с помощью микрошприца 20 мкл раствора В. В правом верхнем углу наносят 3 и 7 мкл стандартного раствора зеараленона; в левом нижнем углу наносят 5 и 10 мкл раствора зеараленона, 2 и 5 мкл раствора В. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью гексан-ацетон (7:3) и элюируют в 1-ом направлении до достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 4,5 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают и сушат на воздухе 5 минут. Затем проводят хроматографию во 2-ом направлении в системе толуол-этилацетат-хлороформ-85%муравьиная кислота (45:25:25:5) до достижения карандашной линии, проведенной в 4,5 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают из камеры, сушат и обнаруживают пятна по флуоресценции после обработки раствором хлорида алюминия как описано в разделе «Обнаружение и идентификация зеараленона с помощью одномерной ТСХ» настоящей Инструкции. Сравнивая интенсивность окраски разных количеств стандарта зеараленона с интенсивностью окраски пятна зеараленона в экстракте (раствор В), определяют количество нг зеараленона в экстракте.

Содержание зеараленона в образце рассчитывают по формуле

$$C = \frac{V1 \times V3 \times m}{V2 \times V4 \times M \times 1000}$$, где

С - концентрация зеараленона в образце в мг/кг;

V1 – объем водно-ацетонитрильной смеси для экстракции в мл (125 мл);

V2 - объем водно-ацетонитрильного фильтрата, взятый для анализа, в мл (50 мл);

V3-объем очищенного экстракта перед ТСХ (раствор В) в мкл (500 мкл);

V4 - объем очищенного экстракта (раствор В),наносимый на пластинку,в мкл (20мкл);

m - масса зеараленона (в нг), в V4 мкл очищенного экстракта, оцененная по ТСХ;

М - навеска образца, взятая для анализа, в г (25 г).

При приведенных в скобках объемах и навесках формула содержания зеараленона выражается следующим образом

С = 0,0025 m, мг/кг

Если интенсивность окраски пятна зеараленона в экстракте выше интенсивности окраски пятна стандарта, соответствующего 20 мкл стандартного раствора (200 нг зеараленона), то на пластинку следует нанести либо меньшее количество экстракта (уменьшить объем V4), либо разбавить раствор В бензолом (увеличить объем V3), внеся соответствующие коррективы в расчетную формулу.

Обнаружение и количественное определение зеараленона с помощью ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза гексан-эфир-уксусная кислота (65:35:1; скорость подвижной фазы 1,5 мл/мин) или петролейный эфир (температура кипения 40-70°С)-эфир-уксусная кислота (50:50:1; скорость подвижной фазы 2 мл/мин.). Рекомендуется использовать перегнанный гексан или петролейный эфир и эфир, профильтрованный через слой оксида алюминия (5 см). УФ детектор устанавливается на длину волны 283 нм, шкала чувствительности 0,005 Е.О.П. Если для записи хроматограмм используется самописец, его шкала 10 мВ. Если используется флуориметрический детектор, то длина волны на линии возбуждения устанавливается около 283 нм, а на линии эмиссии - фильтр от 420 нм (или 440 нм в случае монохроматора на линии эмиссии).

Для калибровки прибора в инжектор с помощью микрошприца вводят 2 и 5 мкл стандартного раствора, что соответствует 20 и 50 нг зеараленона. Для каждого количества стандарта определяют высоту пика на хроматограмме. При описанных условиях ВЭЖХ время выхода пика зеараленона составляет 5-7 минут.

В инжектор хроматографа вводят 10 мкл раствора В. При наличии пика, совпадающего по времени выхода со стандартом, определяют его высоту (h обр.).

Расчет концентрации зеараленона в образце проводят по формуле:

$$C = \frac{V1 \times V3 \times m \times h_{ст}}{V2 \times V4 \times M \times 1000 \times h_{обр}}$$, где

C - концентрация зеараленона в образце в мг/кг;

V1 – объем водно-ацетонитрильной смеси для экстракции в мл (125 мл);

V2 - объем водно-ацетонитрильного фильтрата, взятый для анализа, в мл (50 мл);

V3-объем очищенного экстракта перед ВЭЖХХ (раствор В) в мкл (500 мкл);

V4 - объем очищенного экстракта (раствор В), внесенный в хроматограф, в мкл (20мкл);

M - навеска образца, взятая для анализа, в г (25 г).

m - масса стандарта зеараленона введенная в хроматограф, в нг;

$h_{обр}$ – высота пика, соответствующая данной массе стандарта, в мм, или в единицах компьютерного программного обеспечения обсчета пиков;

$h_{ст}$ - высота пика зеараленона из образца, в мм, или в единицах компьютерного программного обеспечения обсчета пиков.

Если пик зеараленона в образце выходит за пределы шкалы самописца, анализ проводят повторно после разбавления раствора В бензолом, то есть после увеличения объема V3.

При ВЭЖХ зеараленона чувствительность УФ- и флуориметрического детекторов примерно одинаковы. Преимуществом флуориметрического детектора является его селективность (меньшее количество посторонних пиков на хроматограмме).

10. Внутренний оперативный контроль

Внутренний оперативный контроль качества результатов контрольного химического анализа (сходимость, воспроизводимость, точность) осуществляют с целью получения оперативной информации о качестве анализов и принятия при необходимости оперативных мер по его повышению.

Контроль сходимости выходных сигналов

Контролируемым параметром является относительный размах выходных сигналов хроматографа при вводах трех параллельных проб градуировочного раствора. Контроль осуществляется при проведении градуировки, при периодическом контроле градуировочных коэффициентов, а также при выполнении измерений.

Результат контроля признается положительным при выполнении условия:

$$\frac{S_{max} - S_{min}}{S_{ср}} 100 \leq 15\%$$, где

S - площадь пика, $мм^2$;

$S_{ср}$ - среднее арифметическое значение площади пиков при вводе 3 параллельных проб градуировочного раствора.

Оперативный контроль точности

Периодичность контроля погрешности измерений зависит от количества рабочих измерений за контролируемый период и определяется планами контроля.

Образцами для контроля являются представительные пробы исследуемого пищевого продукта, к которым делаются добавки в виде раствора. Отбирают 2 пробы и к одной из них делают добавку в виде раствора таким образом, чтобы их содержание увеличилось по сравнению с исходным на 50—150 %. Каждую пробу анализируют в точном соответствии с прописью методики и получают результат анализа исходной рабочей пробы X и рабочей пробы с добавкой X^1. Результаты анализа исходной рабочей пробы X и рабочей пробы с добавкой X^1 получают не по возможности, а в одинаковых условиях, т. е. их получает один аналитик с использованием одного набора мерной посуды, одной партии реактивов и т.д.

Результаты контроля признаются удовлетворительными, если выполняется условие:

$$|X^1-X-C| < K_Д, \text{ где}$$

C - добавка к пробе в виде раствора с концентрацией, мкг/см^3;

$K_Д$ - норматив оперативного контроля погрешности, мкг/см^3.

При внешнем контроле (P = 0,95) принимают

$$K_Д = \sqrt{\Delta^2_x{}^1 + \Delta^2_x}, \text{ где}$$

$\Delta^2_x{}^1$ и Δ^2_x - характеристики погрешностей для исходной пробы и пробы с добавкой, мкг/см^3.

$$\Delta_x{}^1 = 0{,}165\ X^1 \quad \text{и} \quad \Delta_x = 0{,}165\ X$$

При внутрилабораторном контроле (P=0,90) принимают, что

$$K_Д{}^1 = 0{,}84\ K_Д$$

При превышении оперативного контроля погрешности эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и их устраняют.

Приложение 1
к Инструкции 4.1.10-15-61-2005
«Обнаружение, идентификация и определение содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах»

Разметка пластинки «Silufol» или «Sorbfil»

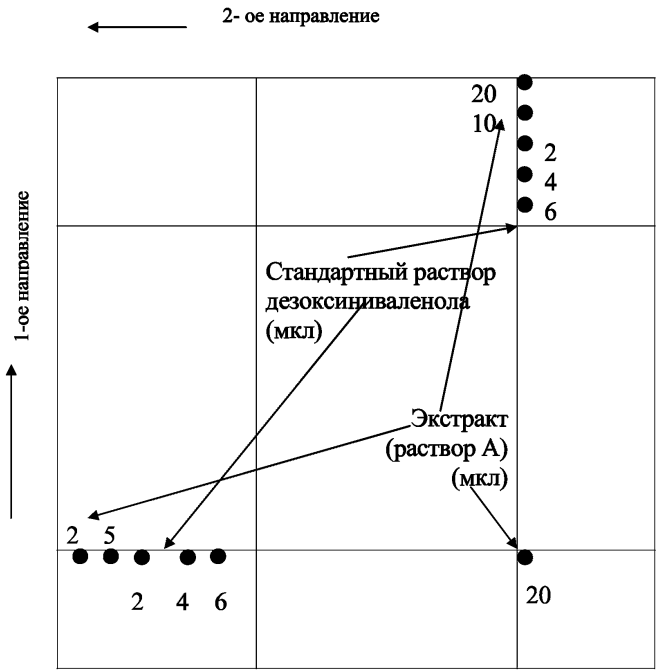


Рисунок 1

Приложение 2
к Инструкции 4.1.10-15-61-2005
«Обнаружение, идентификация и определение содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеареленона в зерне и зернопродуктах»

Разметка пластинки «Silufol» или «Sorbfil»

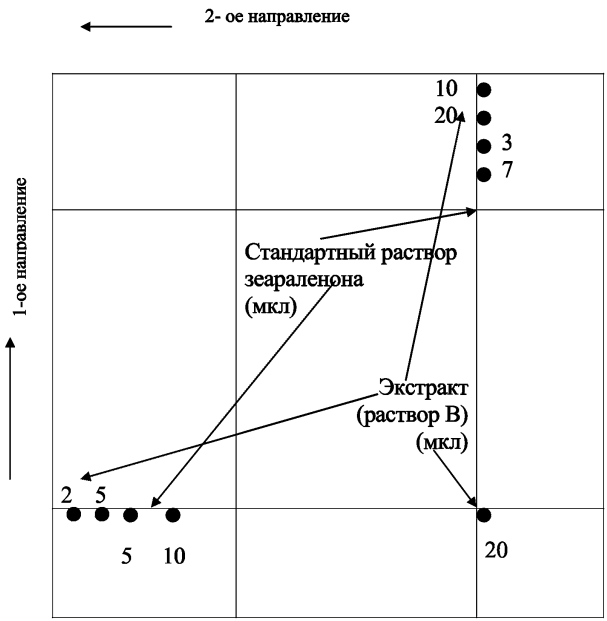


Рисунок 1

gost.e-ecolog.ru