Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение аманитинов и фаллоидина в сырых грибах и продуктах их переработки

Методические указания
МУК 4.1.032—95

Издание официальное

Госкомсанэпиднадзор России
Москва
1995

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.234я8
О62

О62 Определение аманитинов и фаллоидина в сырых грибах и продуктах их переработки: Методические указания.—М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России.—11 с.

ISBN 5—7508—0029—6

1. Разработаны: Институтом питания РАМН (Тутельян В. А., Хотимченко С. А., Бессонов В. В.); Российским Республиканским информационно-аналитическим центром Госкомсанэпиднадзора России (Агеев В. П.); Госкомсанэпиднадзором России (Петухов А. И.).

2. Утверждены и введены в действие Председателем Госкомсанэпиднадзора России - Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Е. Н. Беляевым, 24 июля 1995 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.234я8

ISBN 5—7508—0029—6

© Госкомсанэпиднадзор России

УТВЕРЖДАЮ

Председатель Госкомсанэпиднадзора России – Главный государственный санитарный врач Российской Федерации

Е. Н. Беляев

от 24 июля 1995 года
МУК 4.1.032—95
Дата введения: с момента утверждения.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение аманитинов и фаллоидина в сырых грибах и продуктах их переработки

Методические указания

Область применения

Настоящие методические указания устанавливают ТСХ и ВЭЖХ/УФ-спектрофотометрические методы определения аманитинов и фаллоидина в сырых грибах и продуктах их переработки.

Метод ТСХ предназначается для проведения рутинных и скрининговых исследований, а метод ВЭЖХ предназначается для проведения арбитражных анализов и подтверждения результатов определений, полученных методом ТСХ.

Методические указания предназначены для учреждений госсанэпиднадзора и других ведомств, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов.

1. Метод определения аманитинов и фаллоидина тонкослойной хроматографией

1.1. Сущность метода

Анализ включает в себя пробоподготовку методом жидкостно-жидкостной экстракции метанолом, разделения токсинов

Издание официальное

Настоящие методические указания не могут быть полностью или частично воспроизведены, тиражированы и распространены без разрешения Госкомсанэпиднадзора России.

хроматографией в тонком слое сорбента, детектировании зон абсорбции и количественное определение содержания токсинов визуальным методом, либо с применением денситометра (отражательного спектрофотометра).

Идентификацию токсинов осуществляют сравнением подвижностей обнаруженных в условиях ТСХ веществ, с подвижностью соответствующего стандарта.

Нижний предел определения аманитинов и фаллоидина – 0,03 мг/кг продукта.

1.2. Отбор проб

Навеска массой 50—150 г отбирается из средней пробы, подготовленной в соответствии с действующими ГОСТами на конкретный вид продукции. Отобранные образцы можно хранить в морозильной камере при температуре –8 °С до 10 суток, при температуре –18 °С – до 3-х месяцев.

1.3. Приборы и материалы

Весы технические по ГОСТу 19491—74 и весы аналитические по ГОСТу 24104—80.

Шкаф сушильный, нагревательные приборы (электронагреватель по ГОСТу 13268—83, колбонагреватель или электроплитка по ГОСТу 14919—83).

Ротационный испаритель с ловушкой по ТУ 25—11—917—76.

Насос водоструйный по ГОСТу 10696—75.

Денситометр фирмы «Shimadzu» или подобный.

Контактные термометры по ГОСТу 9871—75.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТу 24104—80 с наибольшим пределом взвешивания до 500 г с пределом допустимой погрешности ±0,038 г.

Микрошприц МШ-10 на 10 мкл или калиброванные стеклянные капилляры.

Аппарат Сокслета.

Воронка Бюхнера по ГОСТу 9147—80.

Мясорубка или гомогенизатор по ГОСТу 15906—79.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ по ТУ 6—09—1678—77.

Цилиндры мерные на 25, 50, 100, 200 мл по ГОСТу 1770—74.

Колбы мерные или пробирки мерные 2, 5, 25, 50 мл по ГОСТу 1770—74.

Колбы круглодонные на 1000, 500, 250, 100, и 50 мл по ТУ 48—52.
Диэтиловый эфир по ГОСТу 842006—82.
Спирт метиловый по ГОСТу 6995—77.
Хлороводородная кислота по ГОСТу 14261—77.
Уксусная кислота по ГОСТу 61—75.
Хлороформ по ГОСТу 20015—74.
Коричный альдегид.
Вода дистиллированная по ГОСТу 6709—72.
Пластинки для ТСХ.
Стандартные и рабочие растворы:
альфа-аманитин, бета-аманитин, фаллоидин – раствор в метаноле концентрации 1 мг/мл.

1.4. Требования техники безопасности при проведении испытаний

Помещение, в котором производится определение токсинов обязательно должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

Работу с образцами, стандартами, другими химическими соединениями и растворителями проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты (очки, перчатки и др.)

В лаборатории, где проводится работа с высокотоксичными токсинами, необходимо всегда иметь достаточное количество этилового спирта для детоксикации, при попадании его на рабочие места и пол.

Транспортировка и хранение токсинов осуществляется в стеклянных запаянных ампулах, обернутых в бумагу и упакованных в металлическую тару.

1.5. Подготовка к испытанию

1.5.1. Приготовление стандартных растворов.

Стандартные растворы токсинов с концентрацией 1 мг/мл используются при анализе в качестве калибровочного стандарта, готовятся из 1 мг сухого стандарта токсина с чистотой 90 %, растворив его в 1 мл метанола для хроматографии. Срок хранения стандартного раствора – 3 месяца при –3 °С.

1.5.2. Подготовка хроматографической пластинки.

Хроматографическую пластинку непосредственно перед анализом промывают диэтиловым эфиром и активируют в сушильном шкафу в течение 1 часа при температуре 110 °С.

1.5.3. Подготовка системы для ТСХ.

Разделение токсинов проводят в системе растворителей:

хлороформ – 5 %-ный раствор коричного альдегида в метаноле - уксусная кислота - вода в соотношении 77 : 33 : 5 : 7,5.

Систему помещают в камеру для ТСХ для предварительного ее насыщения парами растворителей в течение 1 часа.

1.6. Выделение токсинов из навески образца

Навеску 50—80 г измельченных в мясорубке или гомогенизаторе грибов помещают в аппарат Сокслета, добавляют 100 мл метанола и регулируют нагрев таким образом, чтобы один цикл экстракции завершался за 15 минут.

После прохождения 6 циклов метанольный экстракт сливают, отфильтровывают, помещают в круглодонную колбу и упаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 60 °С досуха. Сухой остаток перерастворяют в 2 мл метанола.

1.7. Проведение анализа в тонком слое сорбента

На линию старта хроматографической пластинки, подготовленной по п. 1.5.2, микрошприцами наносят: 50 мкл полученного метанольного экстракта, растворы стандартных образцов, соответствующих 50 мкг (50 мкл стандартного раствора), 25 мкг (25 мкл стандартного раствора) и 75 мкг токсина в пятне.

Помещают хроматографическую пластинку в камеру с системой для ТСХ, предварительно насыщенную парами растворителей, как указано в п. 1.5.3.

По достижении линией фронта верхнего края пластинки, пластинку вынимают, высушивают на воздухе и помещают в эксикатор, на дно которого налита концентрированная хлороводородная кислота. При этом зоны абсорбции визуализуются: аманитины окрашиваются в фиолетовый цвет, фаллоидины – в розовый, сопутствующие вещества – в желтый.

Порядок элюирования токсинов – бета-аманитин, альфа-аманитин, фаллоидин.

Токсины считаются надежно идентифицированными, если разница величин Rf исследуемого пятна и пятна стандартного образца не превышает 0,04.

1.8. Количественное определение токсинов

Количественное определение проводится визуальным методом, сравнивая величину и интенсивность пятен исследуемого вещества и стандартного образца или с использованием денситометра (отражательного спектрофотометра). Условия денситометрии: длина волны 550 нм, скорость сканирования 0,5 см/сек. При использовании денситометра необходимо проведение предварительной калибровки прибора по стандартным образцам токсинов.

2. Спектрофотометрический метод

2.1. Сущность метода

Метод определения аманитинов и фаллоидина в сырых грибах и продуктах их переработки основан на выделении фракции, содержащей токсины путем экстракции метанолом и очистки экстракта на силикагеле; концентрировании экстракта; разделении и количественном определении содержащихся в концентрате веществ, поглощающих в УФ-области.

Идентификацию токсинов осуществляют сравнением времен выхода в условиях ВЭЖХ веществ, поглощающих в УФ-области с временем выхода соответствующего стандарта.

Нижний предел определения токсинов - 0,001 мг/кг продукта.

2.2. Отбор проб

См. раздел 1.2.

2.3. Аппаратура, материалы, реактивы

Весы аналитические по ГОСТу 24104—80.

Шкаф сушильный, нагревательные приборы (электронагреватель по ГОСТу 13268—83, колбонагреватель или электроплитка по ГОСТу 14919—83).

Ротационный испаритель с ловушкой по ТУ 25—11—917—76.

Насос водоструйный по ГОСТу 10696—75.

Контактные термометры по ГОСТу 9871—75.

Жидкостной хроматограф «Shimadzu LC-10A» с УФ-детектором с переменной длиной волны, или подобный; колонка и предколонка с силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом, размер частиц 5 мкм, длина колонки 25 см,

предколонки – 4,5 см, внутренний диаметр – 4,6 мм, объем вводимой пробы 20 мкл.

Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТу 24104—80 с наибольшим пределом взвешивания до 500 г с пределом допустимой погрешности ±0,038 г.

Воронка Бюхнера по ГОСТу 9147—80.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ по ТУ 6—09—1678—77.

Аппарат Сокслета.

Мясорубка или гомогенизатор по ГОСТу 15906—79.

Силикагель с размером частиц 40—100 меш.

Цилиндры мерные на 50, 100, 200 мл по ГОСТу 1770—74.

Колбы мерные или пробирки мерные 2, 5, 25, 50 мл по ГОСТу 1770—74.

Холодильник обратный по ГОСТу 23932—79 и 25336—82.

Колбы круглодонные на 1000, 500, 250, 100 и 50 мл по ТУ 48—52.

Ацетонитрил по ТУ 6—09—3534—74.

Вода дистиллированная по ГОСТу 6709—72.

Спирт метиловый по ГОСТу 6995—77.

Стандартные и рабочие растворы:

альфа-аманитин, бета-аманитин, фаллоидин - растворы в метаноле концентрации С1 = 0,01 мг/мл.

2.4. Требования техники безопасности при проведении испытаний

См раздел 1.4.

2.5. Подготовка к испытанию

2.5.1. Приготовление стандартных растворов.

2.5.1.1. Содержимое ампулы стандартного раствора токсина (1 мг) растворяют в 100 мл метанола и получают стандартный образец концентрации 0,01 мг/мл, плотно закрывают и хранят в холодильнике при температуре -3 °С не более 3 месяцев.

2.5.1.2. Стандартный раствор токсина с концентрацией 1 мкг/мл, используемый при анализе в качестве калибровочного стандарта, готовят из 1 мл стандартного раствора токсина с концентрацией С=0,01 мг/мл, перенеся его в мерную колбу на 10 мл и доведя метанолом до метки.

Стандартные растворы хранят в темном месте в холодильнике в посуде с пришлифованной пробкой не более 3 месяцев.

2.5.1.3. Подготовка к анализу растворителей и реактивов, контроль их чистоты.

Метанол – перегнанный в стекле.

Ацетонитрил – перегнанный в стекле.

Контроль чистоты реактивов:

По 10—20 мл ацетонитрила и метанола раздельно упаривают до объема приблизительно 1 мл и анализируют концентрат на наличие посторонних примесей, поглощающих при 303 нм УФ-области. При отсутствии поглощения – реагенты используются в работе, при наличии поглощения – подвергаются дополнительной очистке путем перегонки на ректификационной насадочной колонне или заменяются на новую партию.

2.5.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ.

Отмеряют 200 мл ацетонитрила, прозрачного при 303 нм, переносят в мерную колбу на 1000 мл, доводят до метки дистиллированной водой, фильтруют, дегазируют.

2.6. Экстракция и очистка токсинов из образца

Навеску 50—80 г измельченных в мясорубке или гомогенизаторе грибов помещают в аппарат Сокслета, заливают 100 мл метанола и регулируют нагрев таким образом, чтобы один цикл экстракции завершался за 15 мин. После прохождения 6 циклов метанольный экстракт сливают, отфильтровывают на бумажном фильтре, на воронке Бюхнера. На фильтр предварительно наносят слой силикагеля в виде суспензии в метаноле с таким расчетом, чтобы получить слой силикагеля толщиной около 5 мм. По окончании фильтрации промывают фильтр 100 мл метанола. Полученный маточный раствор после фильтрации переносят в мерную колбу на 500 мл, доводят до метки метанолом и используют для анализа.

2.7. Проведение анализа

2.7.1. Условия ВЭЖХ.

Скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование проводится при длине волны 303 нм при 0,0025 ед AUFS.

Примечание. При приведенных условиях хроматографирования время выхода пика стандартных растворов:

бета-аманитин (время выхода около 2 мин),

альфа-аманитин (время выхода 4—5 мин),

фаллоидин (8,5—9,5 мин).

2.7.2. Калибровка.

2.7.2.1. Вводят в петлю инжектора 20 мкл стандартного раствора аманитина с концентрацией 1 мкг/мл, измеряют площадь полученного пика стандартного раствора.

2.7.2.2. Повторяют по п. 2.7.2.1. дважды, последовательно введя в хроматограф 10 мкл и 5 мкл стандартного образца.

В диапазоне концентраций 5—20 мкг/мл зависимость площади пика от массы введенного токсина линейна. Строят градуировочный график.

2.7.3. Измерение концентрации токсинов в образце.

2.7.3.1. Отбирают 20 мкл от полученного по п. 2.6 экстракта (доведенного до 500 мл). Вводят его в хроматограф и определяют площадь пика, совпадающего по времени выхода с пиком стандартного раствора.

2.7.3.2. При отсутствии в введенном образце пика, совпадающего по времени выхода с временем выхода стандартного раствора какого-либо токсина (альфа-аманитина, бета-аманитина, фаллоидина), от 500 мл образца отбирают аликвоту 50 мл, упаривают ее в ротационном испарителе (не досуха) при нагреве не выше 60 °С, остаток растворителя удаляют в слабом токе азота. Остаток растворяют в 0,5 мл метанола, отбирают из него 20 мкл и вводят в хроматограф.

2.7.3.3. При отсутствии пиков токсинов в упаренной аликвоте, считается, что токсин отсутствует в образце в пределах чувствительности метода.

2.7.4. Подтверждение наличия токсина в анализируемом образце.

2.7.4.1. При наличии пика токсина в анализируемом образце, смешивают в шприце 10 мкл образца и 10 мкл стандартного раствора токсина с той концентрацией (10 или 100 мкг/мл), площадь пика которой при калибровке более близка к площади пика токсина в образце. Вводят смешанную пробу в хроматограф. Наличие какого-либо из токсинов в образце считается подтвержденным, если полученный в результате совместного ввода пик аманитина не разделяется на два пика, имеет правильную симметричную форму.

2.8. Количественное определение токсинов

Измеряют площадь пика токсина в образце (N), и проводят расчет по приведенной формуле:

$$K = \frac{C \cdot N \cdot V_1 \cdot 100}{S \cdot П \cdot V_2 \cdot R \cdot \%}$$ (мкг/кг), где

К – концентрация токсина в сырых грибах и продуктах их переработки, мкг/кг;

N – площадь пика токсина в исследуемом образце, $см^2$;

П – навеска продукта, кг;

V_1 – объем анализируемой пробы, мкл;

V_2 – объем введенной пробы, мкл;

С – концентрация токсина, введенного в хроматограф из стандартного раствора, мкг;

S – площадь пика токсина, полученного при вводе стандартного раствора, $см^2$;

% – степень извлечения токсина из образца;

R – коэффициент, учитывающий концентрирование образца (при концентрировании по п. 2.7.3.2 R=100).

Статистическая обработка результатов анализа грибов и продуктов их переработки показала, что относительное стандартное отклонение колеблется от 20 до 30 % (при n=5, P=0,89).

Определение аманитинов и фаллоидина в сырых грибах и продуктах их переработки

Методические указания
МУК 4.1.032–95

Ответственный за выпуск Акопова Н. Е.
Редактор Аванесова Л. И.
Технический редактор Зинина С. В.

Подписано в печать 2.10.95.
Формат 60x90/16. Уч.-изд. л. 0,65 Печ. л. 0,8
Тираж 700 экз. Заказ 212

ЛР № 020877 от 20.05.94 г.
Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора
Российской Федерации
101479, Москва, Вадковский пер., 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Информационно-издательским центром Госкомсанэпиднадзора России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11

gost.e-ecolog.ru