ГОСУДАРСТВЕННАЯ КОМИССИЯ СОВЕТА МИНИСТРОВ СССР ПО ПРОДОВОЛЬСТВИЮ И ЗАКУПКАМ

Главное управление ветеринарии

107139. Москва Б-139. Орликов пер., 1/11

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель начальника Главного управления ветеринарии при Государственной комиссии Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам

В.Н. Гущин

« 6 » декабря 1989 г.

МЕТОДИКА

одновременного определения микотоксинов Т-2, Ф-2 , афлатоксина В1 и стеригматоцистина в фуражном зерне

I. Принцип методики

I.I. Определение микотоксинов Т-2, Ф-2, афлатоксина В1 и стеригматоцистина в фуражном зерне основано на извлечении микотоксинов хлороформом, двукратной очистке экстракта от примесей жидкостножидкостным распределением в системе водный ацетон-гексан с двукратной переэкстракцией микотоксинов в хлороформ, дополнительной очистке экстракта хроматографией на колонке силикагеля, элюировании, примесей с колонки гексаном и смесью гексана с ацетоном (98:1) элюировании микотоксинов смесью хлороформа с ацетоном (9:1), хроматографирование концентрированных элюатов микотоксинов на пластинках "'Силуфол" и обнаружении микотоксинов на хроматограмме соответствующими реагентами.

2. Реактивы

Бумага лабораторная фильтровальная, ГОСТ 12026-76

Алюминий хлористый, ГОСТ 3759-65, чда

Ацетон, ТУ 6-09-3513-82, осч 9-5 (при использовании других марок ацетона его следует перегнать)

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72

Гексан, ТУ 6-09-3375-68, ч.

Муравьиная кислота 85%-ная, ГОСТ 5848-73, чда

Натрий сернокислый безводный, ГОСТ 4166-76, чда

Натрий хлористый, ГОСТ 4233-77, хч или чда

п-нитрофенилдиазония тетрафтороборат, прочный красный ЖК, стабилизированная соль.

gost.e-ecolog.ru

Соляная кислота ГОСТ 3118-77, хч или чда

Серная кислота, ГОСТ 4204-77, хч

Силикагель Л, 40-100 мкм, 100-250 мкм, ЧССР для хроматографии или силикагель марки "КСК"

Спирт этиловый ректификованный, ГОСТ 5962-67

Толуол, ГОСТ 5789-78, хч или чда

Хлороформ для наркоза после перегонки

Этилацетат, ГОСТ 22300-76, хч или чда

Стандарты микотоксинов стеригматоцистина, Т-2, Ф-2 (рассылает УкрНИВИ, 252020, г. Киев, ул.Донецкая, 30)

Стандарт афлатоксина B_I (рассылает ВНИИВС,123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5).

3. Приборы, материалы и посуда.

Аппарат для встряхивания (шуттель-аппарат)

Баня водяная электрическая

Вата гигроскопическая медицинская

Весы аналитические лабораторные

Весы лабораторные общего назначения, ГОСТ 24104-80, класса точности 3 с наибольшим пределом взвешивания 500 г.

Источник ультрафиолетового света

Мельница лабораторная

Микрошприц на 10 мкл, МШ-10

Фен электрический

Пластинки для тонкослойной хроматографии "Силуфол", КАУ ЧССР 15х15 см с люминесцентным индикатором

Фильтры бумажные, ТУ 6-09-1678-77

Воронки делительные, вместимостью 50,100,150,300,500 мл

Воронки химические разного диаметра

Колонки для хроматографирования 50х1,5 см (в качестве колонки можно использовать нижнюю часть бюретки вместимостью 100 мл)

Камера для тонкослойной хроматографии, вместимостью 2 л

Чашки выпарительные, фарфоровые, диаметром 45,60,95,120 мм

Колбы для отгона, вместимостью 25,50,100,250,500 мл

Колбы плоскодонные с притертыми пробками, вместимостью 100, 250, 500 мл.

Роторный испаритель

Цилиндры мерные, вместимостью 50,100,250,500 мл.

4. Подготовка реактивов

4.1. 20%-ный раствор алюминия хлористого, приготовленный на 75%-ном этиловом спирте.

4.2. 20%-ный спиртовый раствор серной кислоты.

II,5 мл серной кислоты с удельной массой I,84 небольшими порциями при осторожном перемешивании переносят в мерную колбу вместимостью I00 мл с небольшим количеством этилового спирта (I5-20 мл). После охлаждения к раствору в колбе при постоянном перемешивании добавляют до метки этиловый спирт. Раствор в колбе охлаждают при комнатной температуре и окончательно доводят спиртом до метки.

4.3. I н раствор соляной кислоты. Готовят из фиксанала или разведением концентрированной соляной кислоты с удельной массой I,I9. Для этого 84 мл соляной кислоты отбирают в мерную колбу вместимостью I л и доводят дистиллированной водой до метки.

4.4. 0,05%-ный раствор красного прочного ЖЖ на 50%-ном этиловом спирте готовят перед использованием.

4.5. Основные стандартные растворы микотоксинов Т-2, Ф-2, стеригматоцистина готовят растворением их аналитических стандартов в хлороформе с концентрациями 200, 200 и 2 мкг/мл соответственно, хранят при температуре 5-7°С не более месяца, а раствор микотоксина Ф-2 не более двух недель. В качестве основного стандартного раствора афлатоксина B_I используют его аналитический препарат с концентрацией I0 мкг/мл.

4.6. Стандартные растворы смеси микотоксинов: берут по I мл основных стандартных растворов микотоксинов Т-2, Ф-2 и стеригматоцистина и 2 мл афлатоксина B_I и смешивают их.

4.7. Смесь гексана с ацетоном в соотношении 98:2

4.8. Смесь хлороформа с ацетоном 9:I

4.9. Системы растворителей для тонкослойной хроматографии: толуол-этилацетат-муравьиная кислота (5:4:I) и хлороформ-ацетон-муравьиная кислота (93:7:2).

4.I0. Силикагель. Силикагель Л производства ЧССР используют без предварительной подготовки. Силикагель КСК размалывают на шаровой мельнице и заливают на I8-20 ч соляной кислотой, разбавленной водой I:I. Затем кислоту сливают и силикагель промывают водой до отсутствия в промывных водах следов иона хлора, что контролируют по отсутствию осадка белого цвета при добавлении к I мл промывных вод I мл 2%-ного раствора азотнокислого серебра и I мл азотной кислоты.

После этого силикагель промывают ацетоном, просушивают под тягой до исчезновения запаха ацетона, а затем высушивают в сушильном шкафу при температуре I30°С в течение 4-6 ч. Очищенный и высушенный силикагель просеивают через сито. Для заполнения хроматографической колонки используют фракцию, проходящую через сито с размером отверстий 0,I05 мм и задерживающуюся на сите - 0,075 мм (I50-200 меш).

Силикагель хранят в плотно закрытых сосудах.

5. Ход определения

5.I. Экстракция микотоксинов. Из среднего образца тщательно измельченного фуражного зерна в колбу с притертой пробкой вместимостью 500 мл отбирают пробу массой 25 г и заливают 200 мл хлороформа. Колбу помещают на шуттель-аппарат и встряхивают в течение I,5 ч.

Экстракт фильтруют через химическую воронку с бумажным фильтром в колбу для отгона или в выпарительную чашку.

Осадок зерна с фильтра вновь переносят в колбу со I00 мл хлороформа и продолжают встряхивание в течение 30 мин. Экстракт фильтруют и фильтрат присоединяют к основному отфильтрованному экстракту

Колбу и осадок на фильтре промывают дважды хлороформом (по 25мл Промывные порции хлороформа присоединяют к основному экстракту и объединенный экстракт концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50-55°С до объема 2-3 мл, затем до получения сухого остатка - под вакуумом или в вытяжном шкафу при комнатной температуре.

5.2. Очистка от примесей

5.2.I. Обезжиривание экстракта гексаном.

Сухой остаток растворяют в ацетоне и количественно переносят в делительную воронку вместимостью 300-500 мл (объем ацетона - I00мл К раствору в делительной воронке приливают 50 мл гексана, перемешивают и добавляют I00 мл воды. При нечетком разделении слоев и образовании эмульсии к смеси добавляют 500 мг хлористого натрия. После разделения слоев, водно-ацетоновую фракцию (нижний слой) сливают в колбу или выпарительную чашку, а гексановую фракцию (верхний слой) удаляют. Содержимое колбы или чашки (водно-ацетоновая фракция) переносят в делительную воронку и повторно экстрагируют 25 мл гексана встряхивая воронку в течение 2 мин. Если интенсивность окраски гексановой фракции не ослабевает, эту процедуру повторяют ещё раз, каждый раз удаляя гексановую фракцию.

5.2.2. Переэкстракция микотоксинов в хлороформ.

К водно-ацетоновой фракции в делительной воронке добавляют 4 г хлористого натрия. После растворения хлористого натрия в воронку вносят 50 мл хлороформа и смесь встряхивают в течение 2 мин. После разделения слоев хлороформный слой (нижний) сливают в колбу для отгона или выпарительную чашку (экстракт №I).

К оставшейся водно-ацетоновой фракции в делительной воронке добавляют 8 мл I н раствора соляной кислоты и 25 мл хлороформа и

смесь встряхивают 2 мин. После разделения слоев хлороформный экстракт присоединяют к первому экстракту. Экстракцию хлороформом по 25 мл повторяют дважды, присоединяя хлороформные экстракты к экстракту №I. Объединенные хлороформные экстракты концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50-55°С до объема 2-3 мл, затем до получения сухого остатка - под вакуумом или в вытяжном шкафу при комнатной температуре.

5.2.3. Повторное обезжиривание экстракта гексаном.

Сухой остаток экстракта растворяют в ацетоне и количественно переносят в делительную воронку вместимостью I00 мл (объем ацетона 20мл прибавляют I2 мл гексана, перемешивают и добавляют 20 мл воды.

5.2.4. Повторная переэкстракция микотоксинов в хлороформ.

После разделения слоев гексановую фракцию (верхний слой) удаляют (см.п.5.2.I), а в водно-ацетоновую фракцию в воронке вносят 0,6 г хлористого натрия, после его растворения прибавляют 50 мл хлороформа, воронку встряхивают в течение 2 мин. После разделения слоев хлороформный экстракт (нижний слой) фильтруют в колбу для отгона или выпарительную чашку через бумажный фильтр с 20 г безводного сернокислого натрия, предварительно промытого I0 мл хлороформа (экстракт №2).

В делительную воронку приливают I,2 мл I н раствора соляной кислоты, добавляют 25 мл хлороформа и встряхивают в течение 2 мин.

Хлороформный слой (нижний) фильтруют через тот же бумажный фильтр с безводным сернокислым натрием. Экстракцию по 25 мл хлороформа повторяют дважды. Отфильтрованные хлороформные экстракты присоединяют к экстракту №2. Бумажный фильтр с сернокислым натрием промывают I5мл хлороформа и промывные порции хлороформа присоединяют к основному экстракту. Объединенные хлороформные экстракты концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50-55°С до небольшого объема, а затем до получения сухого остатка - под вакуумом или при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

Концентрированный экстракт с незначительными количествами примесей (наблюдается еле заметный на глаз, в виде налета, осадок) можно непосредственно использовать для хроматографического исследования. Доказательством содержания незначительного количества примесей является также бесцветная или слабо желтая окраска раствора экстракта в 0,3 мл хлороформа. Экстракт с наличием примесей дополнительно очищают колоночной хроматографией.

5.2.5. Очистка колоночной хроматографией.

В нижний конец колонки помещают гигроскопическую вату слоем

I см и в колонку вносят 5 г силикагеля в виде суспензии в гексане. На силикагель наслаивают 3 г безводного сернокислого натрия. Сухой остаток исследуемого экстракта в колбе или выпарительной чашке растворяют в 3 мл хлороформа, добавляют 30 мл гексана и раствор вносят в хроматографическую колонку. После впитывания раствора в сорбент колбу или выпарительную чашку из-под экстракта обмывают 2 мл хлороформа, затем 20 мл гексана и вносят в ту же хроматографическую колонку. После впитывания раствора в сорбент в колонку добавляют 0,5 г безводного сернокислого натрия и последовательно пропускают 50 мл гексана, 50 мл смеси гексан-ацетон (98:2) и 150 мл смеси хлороформ-ацетон (9:1). Гексановый и гексан-ацетоновый элюаты отбрасывают, а хлороформно-ацетоновый элюат собирают в колбе для отгона или выпарительной чашке и концентрируют на роторном испарителе или водяной бане при температуре 50-55°С до получения небольшого объема, затем концентрирование элюата до сухого остатка проводят под вакуумом или при комнатной температуре в вытяжном шкафу.

С сухим остатком элюата поступают одним из следующих способов:

- растворяют в небольшом количестве хлороформа, количественно переносят в небольшую пробирку и концентрируют до получения сухого остатка под вакуумом или на водяной бане при температуре 50-55°С в вытяжном шкафу. Сухой остаток вновь растворяют в 0,3 мл хлороформа;
- переносят также с помощью хлороформа в калиброванную пробирку небольшой вместимости и выпаривают растворитель из пробирки до получения объема раствора - 0,3 мл.

5.3. Определение микотоксинов в пробе хромотографией на пластинках "Силуфол"

5.3.1. Раствор экстракта в объеме по 2; 5; 5; 10 и 15 мкл наносят на каждую из трех пластинок №№ 1, 2, 3. Одновременно с исследуемыми пробами на пластинки наносят 2,5; 5,0; 7,5 и 10 мкл стандартного раствора смеси микотоксинов, что соответствует следующему количеству микотоксинов:

Количество стандартного раствора смеси микотоксинов (мкл)	Содержание микотоксинов (мкг)			
	Т-2	Ф-2	Стеригматоцистин	афлатоксин B_1
2,5	0,1	0,1	0,01	0,001
5,0	0,2	0,2	0,02	0,002
7,5	0,3	0,3	0,03	0,003
10,0	0,4	0,4	0,04	0,004

На каждую пластинку в одну из точек нанесения 5 мкл исследуемой пробы вносят по 2,5 мкл стандартного раствора микотоксинов.

Величина площади стартового пятна нанесенных исследуемых проб должна соответствовать площади стартового пятна стандартных проб.

Пробы наносят на расстоянии I,5 см друг от друга, 2 см от нижнего края пластинки и I см от боковых краев пластинки.

5.3.2. Пластинки №I и №2 помещают в хроматографическую камеру и хроматографируют в системе хлороформ-ацетон-муравьиная кислота (93:7:2). После продвижения фронта растворителя на высоту 8 см от линии старта, пластинки извлекают из камеры, подсушивают в вытяжном шкафу, затем хроматографирование повторяют. Пластинку №3 хроматографируют в системе толуол-этилацетат-муравьиная кислота (5:4:I) и извлекают из камеры после продвижения фронта растворителя на высоту I2 см, затем высушивают в вытяжном шкафу.

5.3.3. Для выявления микотоксина Ф-2 пластинку №I подсушивают в сушильном шкафу 3 мин при II0°С и просматривают в ультрафиолетовой области света (УФЛ) при длинах волн 254 и 365 нм. При наличии в исследуемых пробах токсина Ф-2 на хроматограмме обнаруживают пятна с голубой флуоресценцией, соответствующие по положению и флуоресценции пятнам токсина Ф-2 в стандартных пробах.

При выявлении указанных пятен в УФЛ нижнюю часть пластинки "Силуфол" ниже области расположения пятен микотоксина Ф-2, закрывают полоской плотной бумаги или другой пластинкой. Незакрытую часть пластинки обрабатывают свежеприготовленным раствором красного прочного ЖЖ и помещают в сушильный шкаф при температуре II0°С на 5-7 мин. Микотоксин проявляется в виде желтого пятна в видимой области света. R_f пятна 0,54.

5.3.4. Для выявления токсина Т-2 в присутствии Ф-2 с нижней части пластинки №I снимают прикрытие, пластинку обрабатывают 20%-ным спиртовым раствором серной кислоты и помещают её в сушильный шкаф при температуре II0-I20°С. После небольшого потемнения пластинку извлекают из шкафа, охлаждают и просматривают в длинноволновой области (365 нм) УФЛ. При наличии токсина Т-2 в исследуемых пробах на хроматограмме обнаруживают пятна с голубой флуоресценцией, соответствующие по положению и цвету пятнам токсина Т-2 в стандартных пробах. R_f пятна 0,29.

5.3.5. Для обнаружения стеригматоцистина пластинку №2 просматривают в УФЛ (365 нм). При наличии в исследуемых пробах стеригматоцистина в количествах 0,I мкг и выше на хроматограмме наблюдаются пятна с флуоресценцией красно-кирпичного цвета.

Для выявления малых количеств стеригматоцистина, меньше 0,I мк

пластинку обрабатывают 20%-ным спиртовым раствором хлористого алюминия, нагревают при 80°С 5 мин и просматривают в УФЛ (365нм) на наличие зоны зеленовато-желтой флуоресценции, соответствующей стандарту стеригматоцистина. Rf пятна стеригматоцистина - 0,78.

При наличии в исследуемых пробах токсина Ф-2 на пластинке №2 после обработки 20%-ным спиртовым раствором хлористого алюминия обнаруживают пятна с синей флуоресценцией, соответствующие по положению и характеру флуоресценции пятнам Ф-2 в стандартных пробах.

5.3.6. Индикацию афлатоксина B_I проводят на пластинке №3. Пластинку просматривают в УФЛ (365 нм) и при наличии афлатоксина B_I в исследуемых пробах обнаруживают пятна с синей флуоресценцией, соответствующей флуоресценции стандарта афлатоксина B_I·Rf пятна афлатоксина 0,36.

5.4. Оценка результатов.

5.4.I. Количество микотоксинов Т-2[x], стеригматоцистина, афлатоксина B_I в исследуемых пробах определяют сравнением интенсивности флуоресценции пятен микотоксинов в исследуемых и стандартных пробах, а микотоксина Ф-2 после обработки пластинки раствором красного прочного ЖЖ.

5.4.2. Если содержание микотоксинов в исследуемых пробах превышает содержание микотоксинов в стандартных пробах исследуемый раствор разбавляют хлороформом в два или три раза и полученный раствор снова наносят на "Силуфол" для хроматографического исследования. Разведение учитывают при расчете.

5.4.3. Расчет результатов анализа.

Концентрацию микотоксинов в мкг/кг зерна вычисляют по формуле:

$$X = \frac{B \cdot У_2 \cdot 1000 \cdot 2{,}5}{У_I \cdot Д}$$, где

X - концентрация микотоксинов,мкг/кг;

B - концентрация микотоксинов в хроматографируемой исследуемой пробе (мкг);

$У_I$ - объем хроматографируемой исследуемой пробы - 0,002; 0,005; 0,01; 0,015 мл;

$У_2$ - общий объем исследуемой пробы, приготовленный для хроматографирования - 0,3 мл или объем с учетом разбавления;

Д - масса исследуемой пробы - 25 г;

1000 - пересчет на 1 кг зерна;

x) Количественное определение токсина Т- 2 возможно при наличии примесей в небольших количествах.

2,5 - коэффициент, учитывающий потери микотоксинов.

5.4.4. Пределы обнаружения микотоксинов: Т-2 500-700 мкг/кг, Ф-2 250-300 мкг/кг, афлатоксина B_I I0-I5 мкг/кг, стеригматоцистина 80-I00 мкг/кг зерна.

6. Техника безопасности

6.I. При проведении исследований необходимо соблюдать общепринятые правила техники безопасности, предусмотренные для работ с органическими растворителями, УФ-светом и токсическими веществами.

x x

x

Методика разработана ВНИИ ветеринарной санитарии.

gost.e-ecolog.ru