Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Обнаружение, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2204—07

Издание официальное

Москва • 2007

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Обнаружение, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2204—07

ББК 51.23
О20

О20 **Обнаружение**, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.—12 с.

ISBN 5—7508—0720—7

1. Разработаны: ГУ НИИ питания РАМН (академик РАМН, профессор В. А. Тутельян, д.х.н. К. И. Эллер, к.м.н. И. В. Аксёнов).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 20 мая 2007 г. и введены в действие с 1 августа 2007 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Редакторы Н. Е. Акопова, Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 26.12.07

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 500 экз. Заказ 35

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом информационно-издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2007
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007

Содержание

1. Назначение и область применения ... 4
2. Общие положения ... 4
3. Принцип метода ... 5
4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, реактивы и материалы ... 6
4.1. Средства измерений ... 6
4.2. Вспомогательное оборудование ... 6
4.3. Реактивы и материалы ... 7
5. Подготовка к выполнению измерений ... 7
5.1. Приготовление стандартных растворов охратоксина А ... 7
5.2. Приготовление фосфатного буферного раствора, pH = 7,4 ... 8
5.3. Приготовление смесей растворителей ... 8
6. Отбор и подготовка проб для анализа ... 9
6.1. Отбор проб ... 9
6.2. Подготовка проб для анализа ... 9
6.2.1. Экстракция ... 9
6.2.2. Очистка экстракта ... 9
7. Выполнение измерений ... 9
7.1. Приготовление тестового образца ... 9
7.2. Условия хроматографирования ... 10
8. Обработка результатов измерения ... 10
8.1. Построение градуировочной зависимости ... 10
8.2. Оформление результатов ... 10
8.3. Проверка приемлемости результатов параллельных определений ... 11
9. Контроль качества результатов измерений ... 11
10. Требования техники безопасности ... 12
11. Требования к квалификации исполнителя ... 12
12. Условия выполнения измерений ... 12

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
20 мая 2007 г.
Дата введения: 1 августа 2007 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Обнаружение, идентификация и количественное определение охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2204—07

1. Назначение и область применения

Методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определения охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах и предназначены для проведения лабораторных исследований учреждениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в организациях, осуществляющих контроль безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов.

2. Общие положения

Охратоксин А – микотоксин, продуцируемый микроскопическими грибами родов Aspergillus и Penicillium. Основными продуцентами охратоксина А являются A. ochraceus и P. verrucosum.

Охратоксин А ($C_{20}H_{18}ClNO_6$; молекулярная масса 403,8), представляющий собой по химической структуре 5-хлоризокумарин, связанный пептидной связью с L-фенилаланином, хорошо растворим в полярных органических растворителях и водном растворе гидрокарбоната натрия, малорастворим в воде. При фотометрировании раствора охратоксина А

в толуол-уксусной кислоте (99 : 1) максимум поглощения наблюдается при длине волны, равной 333 нм, при этом относительный молярный коэффициент поглощения равен 544 $м^2$/моль.

В экспериментах in vivo показано нефротоксическое, канцерогенное, тератогенное, эмбриотоксическое, нейротоксическое и иммунотоксическое действие охратоксина А. Международное агентство по изучению рака классифицирует охратоксин А как соединение, потенциально канцерогенное для человека (Группа 2В). Комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам и контаминантам установлена величина условно переносимого недельного поступления охратоксина А с пищей – 100 нг/кг массы тела.

Охратоксин А выявляется повсеместно в качестве природного загрязнителя продовольственного и кормового зерна, кофе и какао-бобов, винограда и специй.

3. Принцип метода

Метод включает следующие этапы:

- экстракция охратоксина А из пробы смесью ацетонитрил–вода (60 : 40 % об.);
- очистка экстракта на иммуноаффинной колонке;
- определение охратоксина А с помощью ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием при длине волны возбуждения ($\lambda_{возб.}$) 333 нм и длине волны эмиссии ($\lambda_{эмис}$) 466 нм.

Диапазон определяемых концентраций: 0,0001—0,016 мг/кг.

Предел количественного определения: 0,0005 мг/кг.

Таблица

Метрологические характеристики метода, установленные для разных концентраций охратоксина А в пробе

Метрологические характеристики	Концентрация охратоксина А в пробе, мг/кг	
	0,0001—0,001	> 0,001
Границы относительной погрешности (показатель точности) (±δ), %, $P = 0,95$	± 30,72	± 10,92
Стандартное отклонение повторяемости (σ_r), %	24,56	8,78
Предел повторяемости (r), %	68,77	24,58
Полнота извлечения веществ, %	88,80	86,28

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, реактивы и материалы

4.1. Средства измерений

Система ВЭЖХ, состоящая из насоса высокого давления, инжектора типа Rheodyne-7125 с объемом петли-дозатора 50 мкл, спектрофлуориметрического детектора, обеспечивающего возбуждение флуоресценции в спектральной области 330—340 нм и регистрацию эмиссии флуоресценции при длине волны 466 нм и системы для сбора и обработки данных типа Мультихром (Амперсенд, Россия) или аналогичной, хроматографической колонки (250 × 4,6 мм), заполненной силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом с размером частиц 5 мкм (например, Kromasil C18 (MetaChem Texnologies, США)	
Весы аналитические	
Микрошприц на 100 мкл для ВЭЖХ	
Дозатор пипеточный, 1—5 $см^3$	
Дозатор пипеточный, 100—1 000 мкл	
Дозатор пипеточный, 10—100 мкл	
Цилиндры мерные с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$ тип 2-100 и 2-250	ГОСТ 1770—74

4.2. Вспомогательное оборудование

Спектрофотометр	
Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С или аналогичный	ТУ 64-1-2451
Ротационный испаритель ИР-1М с ловушкой или аналогичный	ТУ 25-11917
Электрошкаф сушильный лабораторный с погрешностью поддержания температуры ± 2,5 в интервале от 50 до 350 °С	ТУ 16-531.639
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317
Мельница лабораторная электрическая ЭМ-3А или аналогичная	ТУ 46-22-236—79
pH-метр	
Магнитная мешалка типа ММ 5 с перемешивающим стержнем	ТУ 25-11.834—80

Колбы плоскодонные конические на 250 см^3 с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32	ГОСТ 10394—74
Флаконы стеклянные завинчивающиеся из темного стекла (вайл), объемом 7 см^3	
Колбы мерные, вместимостью 100, 500, 1 000 см^3 тип 2-100-2, 2-500-2	ГОСТ 1770—74
Воронки лабораторные	ГОСТ 25336
Колбы грушевидные на 10 см^3 с НШ 14,5, тип ГрКШ-10-14/23	ГОСТ 10394—72

4.3. Реактивы и материалы

Стандарт охратоксина А, фирма «Sigma», кат. № О-1877	
Фильтры обеззоленные «синяя лента»	ТУ 6-09-1678
Натрий фосфорно-кислый двузамещенный, 12-водный, чда	ГОСТ 4172—76
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, 2-водный, чда	ГОСТ 245—76
Натрий хлорид, хч	ГОСТ 4233—77
Ацетонитрил, осч, сорт 0	
Метанол, осч	ГОСТ 6995—77
Кислота фосфорная, осч	ТУ 2612-014-00203677—97
Кислота уксусная ледяная, хч	ГОСТ 61—75
Толуол, чда	ГОСТ 5789—78
Иммуноаффинные колонки Ochraprep (R-Biopharm, Великобритания)	

5. Подготовка к выполнению измерений

5.1. Приготовление стандартных растворов охратоксина А

Для приготовления стандартного раствора хранения (концентрация охратоксина А – 10 нг/мкл) навеску кристаллического охратоксина А массой 5 мг помещают в мерную колбу объемом 500 см^3, приливают 50 см^3 смеси толуол–уксусная кислота (98 : 2 % об.), тщательно перемешивают до полного растворения вещества и доводят той же смесью растворителей до метки. Для установления точной концентрации раствора хранения измеряют его оптическую плотность при длине волны 333 нм ($Д_{333}$). Концентрацию раствора вычисляют по формуле:

$$C = \frac{Д_{333} \cdot 403{,}8 \cdot 100}{544}, \text{ нг/мкл}$$

Далее 5 см^3 стандартного раствора охратоксина А с концентрацией 10 нг/мкл разбавляют смесью толуол–уксусная кислота (98 : 2 % об.) до объема 100 см^3, получая рабочий раствор с концентрацией 0,5 нг/мкл.

Для приготовления рабочих растворов охратоксина А с концентрацией 0,005; 0,05 и 0,1 нг/мкл отбирают соответственно 50, 500 и 1 000 мкл раствора с концентрацией 0,5 нг/мкл, упаривают досуха и растворяют в 5 см^3 подвижной фазы.

Раствор хранения охратоксина А содержат в стеклянной посуде с притертой пробкой в темном прохладном месте (при температуре около 0 °С) до одного года и используют для приготовления рабочих стандартных растворов. Рабочие стандартные растворы хранят в вайлах из темного стекла в темном прохладном месте (при температуре около 0 °С) в течение 1 месяца.

Перед использованием рабочих стандартных растворов их следует довести до комнатной температуры и только после этого следует открывать пробки.

5.2. Приготовление фосфатного буферного раствора, pH = 7,4

Навеску натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного массой 1,15 г, навеску натрия однозамещенного 2-водного массой 0,124 г и навеску натрия хлорида массой 1,74 г переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 10—20 см^3 дистиллированной воды. Перемешивают и доводят объем раствора в колбе до метки. Срок хранения – 1 месяц в холодильнике.

5.3. Приготовление смесей растворителей

Толуол–уксусная кислота (98 : 2 % об.).

В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 20 см^3 уксусной кислоты и, перемешивая, доводят толуолом до метки. Срок хранения – 1 месяц в темном прохладном месте.

Ацетонитрил–вода (60 : 40 % об.).

В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 600 см^3 ацетонитрила и, перемешивая, доводят водой до метки. Срок хранения – 1 месяц в темном прохладном месте.

Ацетонитрил–вода (60 : 40 % об.; pH = 3,0).

В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 600 см^3 ацетонитрила и, перемешивая, доводят бидистиллированной водой до метки. Внесением фосфорной кислоты подводят pH смеси до величины, равной 3,0. Срок хранения – 1 месяц в темном прохладном месте.

Метанол–уксусная кислота (98 : 2 % об.).

В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 20 см^3 уксусной кислоты и, перемешивая, доводят метанолом до метки. Срок хранения – 1 месяц в темном прохладном месте.

6. Отбор и подготовка проб для анализа

6.1. Отбор проб

Для учета специфики отбора проб отдельных видов продуктов следует руководствоваться действующей нормативно-технической документацией:

- «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб» ГОСТ 13586.3—83;
- «Крупа. Правила приемки и методы отбора проб» ГОСТ 26312.1—84;
- «Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб» ГОСТ 27668—88;
- «Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию» ГОСТ 8756.0—70.

Пробы для анализа, представительные по концентрации микотоксинов для всей партии, следует отбирать из предварительно гомогенизированного среднего (исходного) образца массой 2 кг.

6.2. Подготовка проб для анализа

Отобранные пробы измельчают в течение 1—2 мин в лабораторной мельнице. При этом используют две параллельные пробы.

6.2.1. Экстракция

Навеску 25 г измельченной пробы помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ смеси ацетонитрил–вода (60 : 40 % об.). Экстрагируют на аппарате для встряхивания проб в течение 30 мин. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр «синяя лента». Отбирают 10 $см^3$ фильтрата и добавляют 90 $см^3$ фосфатного буферного раствора, pH = 7,4.

6.2.2. Очистка экстракта

На иммуноаффинную колонку наносят 100 мл полученной смеси со скоростью 1—2 капли в секунду, промывают 20 $см^3$ фосфатного буферного раствора, pH = 7,4. Охратоксин А элюируют 3 $см^3$ смеси метанол–уксусная кислота (98 : 2 % об.).

7. Выполнение измерений

7.1. Приготовление тестового образца

Элюат упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 400 мкл подвижной фазы (раствор А).

7.2. Условия хроматографирования

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза – ацетонитрил–вода (60 : 40 % об.; pH = 3,0); скорость подвижной фазы – 1,5 $см^3$/мин.

Флуориметрический детектор устанавливают на длину волны возбуждающего излучения 333 нм, на линии эмиссии устанавливают эмиссионный фильтр с полосой пропускания 466 нм.

Для анализа проб в инжектор хроматографа вводят с помощью микрошприца 50 мкл тестового образца (раствора А). При наличии пика, совпадающего по времени удерживания с охратоксином А, рассчитывают массу охратоксина А во вколе с помощью градуировочного графика.

8. Обработка результатов измерения

8.1. Построение градуировочной зависимости

Для построения градуировочного графика проводят хроматографический анализ серии рабочих растворов стандартов. В инжектор с помощью микрошприца вводят 50 мкл рабочего раствора стандарта с концентрацией 0,005 нг/мкл, что соответствует 0,25 нг охратоксина А. Подобное делается для других стандартных растворов с концентрациями 0,05 и 0,10 нг/мкл, что в свою очередь соответствует 2,5 и 5,0 нг охратоксина А во вколе. В указанных условиях время удерживания находится для охратоксина А в диапазоне от 4 до 5 мин. На основании полученных данн0ых строят градуировочный график (зависимость площади хроматографического пика от массы охратоксина А во вколе).

8.2. Оформление результатов

Расчет концентрации охратоксина А в пробе проводится по формуле:

$$C_{(охр.А)} = \frac{m \cdot V_1 \cdot V_3}{M \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot 1000}, \text{ где}$$

$C_{(охр\ А)}$ – концентрация охратоксина А в пробе, мг/кг;

M – масса навески для анализа, г (25,0);

m – масса охратоксина А, соответствующая введенному в хроматограф объему раствора А, нг;

V_1 – объём раствора для экстракции, $см^3$ (100);

V_2 – объём экстракта, нанесенный на ИАК, $см^3$ (10);

V_3 – общий объём раствора А, $см^3$ (0,4);

V_4 – объём раствора А, введенный в хроматограф, $см^3$ (0,05).

При высоких уровнях загрязнения охратоксином А пробы необходимо увеличить объем раствора А (V_3) с внесением соответствующих изменений в формулу.

За окончательный результат испытаний принимается среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений:

$$\overline{X} = (C_{(охр\ А)1} + C_{(охр\ А)2})/2, \text{ мг/кг}$$

Результат анализа представляют в виде (при вероятности $P = 0,95$):

$$(\overline{X} \pm \Delta), \text{ мг/кг, где}$$

Δ – граница абсолютной погрешности:

$$\Delta = \delta \cdot \overline{X} / 100, \text{ мг/кг}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности), % (табл. 1).

Если содержание охратоксина А в пробе менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«содержание охратоксина А в пробе зерна менее 0,0001 мг/кг»*

8.3. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

Допустимое расхождение между параллельными измерениями (R) определяют на основании предела повторяемости (r) (табл. 1):

$$R = 0,01\,(r, \%) \cdot \overline{X}, \text{ мг/кг}$$

Если расхождение между параллельными определениями не превышает допустимого:

$$| C_{(охр\ А)1} - C_{(охр.\ А)2} | \le R,$$

то среднее арифметическое принимают за результат анализа.

При превышении норматива R следует повторить измерения, используя резервные пробы.

9. Контроль качества результатов измерений

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

Образцами контроля являются рабочие пробы продовольственного сырья и пищевых продуктов. Отбирают пробу и разделяют ее на 2 равные части. Одну из них оставляют без изменений, а к другой добавляют такое количество раствора стандарта охратоксина А, чтобы его массовая доля в пробе по сравнению с исходным значением увеличилась на 50—100 %. Добавка должна вводиться в пробу перед началом пробоподготовки.

* 0,0001 мг/кг – предел обнаружения.

Обе пробы анализируют в точном соответствии с прописью методики и получают результаты анализа исходной пробы ($C_{(охр.\ А)}$) и пробы с добавкой ($C'_{(охр.\ А)}$). Определение проводят в одинаковых условиях, а именно: анализ проводит один аналитик, с использованием одного набора мерной посуды, реактивов, растворов и т. д.

Алгоритм проведения оперативного контроля погрешности с использованием метода добавок состоит в сравнении результата контрольного определения, равного разности между результатом контрольного измерения пробы с добавкой ($C'_{(охр\ А)}$), пробы без добавки ($C_{(охр.А)}$) и величиной добавки ($C_{доб(охр.\ А)}$) с нормативом оперативного контроля (K). Решение об удовлетворительной погрешности принимается при выполнении следующего условия (при $P = 0{,}95$):

$$|C'_{(охр\ А)} - C_{(охр\ А)} - C_{доб(охр\ А)}| \le K$$

Норматив оперативного контроля погрешности рассчитывают по формуле ($P = 0{,}90$):

$$K = 0{,}84 \cdot (\Delta^2 C'_{(охр.\ А)} + \Delta^2 C_{(охр.\ А)})^{1/2}$$

При превышении норматива оперативного контроля погрешности эксперимент повторяют с использованием другой пробы.

10. Требования техники безопасности

При выполнении анализов необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.2.007.0 и ГОСТ 4658. Помещение лаборатории должно соответствовать санитарным правилам проектирования, оборудования, эксплуатации и содержания производственных и лабораторных помещений, предназначенных для проведения работ с органическими растворителями. Аналитическая лаборатория должна быть оснащена вентиляционными системами по ГОСТ 12.4.021.

11. Требования к квалификации исполнителя

К выполнению анализа охратоксина А в зерне и зернопродуктах допускаются лица со специальным высшим образованием или средним специальным образованием, владеющие техникой ВЭЖХ-анализа, прошедшие соответствующую подготовку и имеющие опыт работы в химической лаборатории.

12. Условия выполнения измерений

Температура окружающего воздуха от 15 до 25 °С.

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

Атмосферное давление 730—760 мм рт.ст.

Напряжение электропитания: 210—220 В. Частота переменного тока: 45—50 ГЦ.

gost.e-ecolog.ru