МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО - ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ
УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье.

3184-84

Москва — 1984 г.

gost.e-ecolog.ru

Методические указания предназначены для лабораторий санитарно - эпидемиологических станций и институтов гигиенического профиля при контроле за загрязнением пищевых продуктов Т-2 токсином.

Разработаны в лаборатории энзимологии питания Института питания АМН СССР (рук. лаборатории доктор медицинских наук Тутельян В. А., старший научный сотрудник, кандидат химических наук Эллер К. И., младший научный сотрудник Соболев В. С.)

"УТВЕРЖДАЮ"

Заместитель Главного
государственного санитарного
врача СССР (Ковшило В.Е.)

29 декабря 1984 г.
№ 3184-84

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ Т-2 ТОКСИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ.

Т-2 токсин - 8-(3-метилбутирилокси)-4,15-диацетокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-3-ол - микотоксин, продуцируемый различными видами микроскопических грибов рода Fusarium. Наиболее распространенными продуцентами Т-2 токсина являются грибы Fusarium sporotrichiella, которые рассматриваются как этиологический фактор тяжелых алиментарных токсикозов человека и сельскохозяйственных животных.

Т-2 токсин является одним из наиболее токсичных представителей группы трихотеценовых микотоксинов, токсическое действие которых характеризуется поражением кроветворных и иммунокомпетентных органов, развитием геморрагического синдрома, лейкопенией, анемией, поражением функций желудочно-кишечного тракта. Т-2 токсин обладает высокой острой токсичностью (LD_{50} для различных видов млекопитающих от 3 до 10 мг/кг массы тела).

Опасность, которую трихотеценовые микотоксины могут представлять для здоровья человека, связана с повсеместной распространенностью грибов-продуцентов, преимущественно поражающих зерно и зернопродукты, и их высокой токсичностью. В связи с этим установлена ПДК на содержание Т-2 токсина в пищевых продуктах на уровне 0,1 мг/кг.

Т-2 токсин ($C_{24}H_{34}O_9$) - белое кристаллическое вещество моле-

кулярной массой 466, не имеет максимумов поглощения в УФ-спектре при длине волны более 210 нм, не обладает флуоресценцией. Т-2 токсин хорошо растворим в бензоле, ацетоне, этилацетате, спиртах, практически нерастворим в воде и гексане. Температура плавления Т-2 токсина 151-152° С.

Для обнаружения Т-2 токсина при тонкослойной хроматографии (ТСХ) используется его свойство флуоресцировать в длинноволновом УФ-свете (365 нм) после обработки спиртовым раствором серной кислоты с последующим нагреванием при 100-105° С. Этим методом можно обнаружить до 100 нг Т-2 токсина в пятне. Наиболее достоверным и высокочувствительным методом обнаружения и идентификации Т-2 токсина является газожидкостная хроматография (ГЖХ) его летучих производных с использованием детектора электронного захвата (ДЭЗ), который позволяет обнаруживать до 1-2 нг токсина в пике.

В основу предлагаемого метода определения Т-2 токсина положена ГЖХ трифторацетильного (ТФА) производного этого токсина с использованием ДЭЗ.

Предел обнаружения Т-2 токсина при ГЖХ с использованием ДЭЗ - до 1-2 нг во вколе, общий предел обнаружения метода - до 50 мкг/кг (0,05 мг/кг), относительное стандартное отклонение - 0,2-0,25.

Продолжительность анализа - 4 часа.

Метод включает следующие этапы:

- экстракцию Т-2 токсина из образца смесью ацетонитрил-4% водный раствор хлористого калия (9:1);

- очистку экстракта с помощью жидкость-жидкостной экстракции гексаном и бензолом и препаративной ТСХ;

- разделение, идентификацию и количественное определение Т-2 токсина в виде ТФА производного с помощью ГЖХ с использованием ДЭЗ.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6с по ТУ 64-1-2451-78.
2. Ротационный испаритель с ловушкой по ТУ 25-11-917-76 (завод "Химлабприбор").
3. Кофемолка ЭКМ-3У.
4. Хроматограф газовый серии "Цвет - 100" с детектором постоянной скорости рекомбинации (ДЗЗ); колонка стеклянная 1 м х 0,4 см с жидкой фазой ov -1 или ov -101 на Хроматоне у -супер ("Чахема", ЧССР); в качестве самописца - регистрирующий потенциометр КСП-4 модификация 41.130.90.909 или 41.140.90.910 с диапазоном измерений 1 мВ; газ-носитель и продувочный газ - азот особой чистоты.
5. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) ТУ 64-1-1080-78 или диагностическая лампа ОЛД-41.
6. Магнитная мешалка любого типа.
7. Микрошприц МШ-10 на 10 мкл, микрошприц МШ-1 или "Газохром-101" на 1 мкл.
8. Камеры для ТСХ с притертыми крышками (например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 х 190 х 200 завода "Дружная горка").
9. Пластины для ТСХ "Силуфол" размером 20 х 20 см (ЧССР).
10. Воронки делительные ВД 2-250 по ГОСТ 8613-75.
11. Колбы плоскодонные конические на 250 мл с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32 по ГОСТ 10394-78.
12. Колбы круглодонные на 250 мл с НШ 29, тип ККШ-250-29/32 по ГОСТ 10394-72.
13. Колбы грушевидные на 50 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23 по ГОСТ 10394-72.
14. Колбы мерные на 100 мл, тип 2-100-2 по ГОСТ 1770-74.
15. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 по ГОСТ 1770-74.

16.Распылитель стеклянный с грушей.

17.Т-2 токсин кристаллический, номер по каталогу Т 4887, фирма "Сигма", США (по поводу получения стандарта Т-2 токсина обращаться в Институт питания АМН СССР).

18.Ацетонитрил "ч" по ТУ 6-09-3534-74.

19.Ацетон "чда" по ГОСТ 2603-79.

20.Бензол "чда" по ГОСТ 5955-75.

21.Гексан "ч" по ТУ 6-09-3375-78.

22.Метанол "чда" по ГОСТ 6995-77.

23.И. о-пропиловый спирт (пропанол-2) "хч" по ТУ 6-09-402-75.

24.Кислота серная "чда" по ГОСТ 4204-77.

25.Калий хлористый "чда" по ГОСТ 4234-77.

26.Натрий сернокислый безводный "чда" по ГОСТ 4166-76.

27.Натрий углекислый "чда" по ГОСТ 83-79, свежепрокаленный.

28.Трифторуксусный ангидрид "ч" по ТУ 6-09-4135-75.

I. ЭКСТРАКЦИЯ.

При отборе пробы для анализа следует руководствоваться требованиями ГОСТа 12430-66 "Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образцов при карантинном досмотре и экспертизе". Отобранную пробу измельчают в течение 1-2 минут в кофемолке или лабораторной мельнице. Навеску 20 г измельченного продукта помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, добавляют 10 мл 4% раствора хлористого калия и 90 мл ацетонитрила. Встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр, отбирают 70 мл фильтрата (аликвота соответствует 14 г исходного образца).

2. ОЧИСТКА ЭКСТРАКТА

2.I. Жидкость-жидкостная экстракция.

В делительную воронку на 250 или 500 мл переносят 70 мл фильтрата, добавляют 50 мл гексана (или гептана). После встряхивания и разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают. Нижний ацетонитрильный слой еще дважды встряхивают с 40 мл гексана, каждый раз отбирая верхний гексановый слой. Ацетонитрильный слой разбавляют I7 мл дистиллированной воды и экстрагируют 50 и 25 мл бензола. Верхние бензольные слои отделяют и сушат безводным сернокислым натрием (I0-I5 г) в течение 0,5 часа. Раствор фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в круглодонную колбу на 250 мл с НШ 29. Сернокислый натрий промывают I0 мл бензола и отфильтровывают бензол в ту же круглодонную колбу. Упаривают бензольный раствор на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 45-50°С досуха. Остаток растворяют в 200-300 мкл бензола и очищают с помощью препаративной ТСХ (раствор А).

2.2. Очистка с помощью препаративной ТСХ.

Пластинку "Силуфол" (20 х 20 см) размечают в соответствии с рис.I. В правом и левом нижних углах пластинки на расстоянии I,5 см от краев наносят по 5 мкл стандартного раствора Т-2 токсина в бензоле (по 500 нг Т-2 токсина). Параллельно нижнему краю пластинки на расстоянии I,5 см от нижнего края равномерно наносят с помощью шприца на I0 мкл раствор А в виде прямой линии шириной не более 3 мм. После нанесения всего раствора А в круглодонную колбу добавляют еще I00-I50 мкл бензола и наносят бензольную промывку на ту же прямую линию. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью гексан - изо-пропиловый спирт (7:2). Развивают пластинку до достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в I,5 см от верх-

него края пластинки. Пластинку извлекают из камеры и высушивают. Разрезают пластинку по линиям А и Б. Узкие полоски пластинки с нанесенным раствором Т-2 токсина опрыскивают 20% раствором серной кислоты в метаноле. Пластинки выдерживают в сушильном шкафу при 105°С в течение 1-3 минут и рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Пятна Т-2 токсина (бело-голубая флуоресценция, R_f 0,6-0,7) обводят тонкой карандашной линией. Затем узкие полоски прикладывают к пластинке с нанесенным экстрактом и отмечают на этой пластинке зону, соответствующую хроматографической подвижности стандарта Т-2 токсина. Ширина зоны должна быть примерно на 7 мм (с каждой стороны) больше протяженности пятна стандарта Т-2 токсина в направлении развития хроматограммы; зону отмечают в виде 2 карандашных линий, параллельных нижнему краю пластинки. Силикагель из отмеченной зоны соскабливают с помощью скальпеля или шпателя в пробирку на 5 мл, приливают 4 мл смеси бензол-ацетон (1:1) и встряхивают. Суспензию силикагеля фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в грушевидную колбу на 50 мл с НШ 14,5. Силикагель повторно (2 х 4 мл) промывают смесью бензол-ацетон (1:1). Объединенные бензол-ацетоновые экстракты упаривают досуха на ротационном испарителе. Остаток переносят 200 мкл бензола в пробирку на 5 мл с НШ 14,5 (раствор В).

3. ОБНАРУЖЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ Т-2 ТОКСИНА.

3.1. Приготовление стандартного раствора Т-2 токсина.

Навеску 10 мг кристаллического Т-2 токсина помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки бензолом. Концентрация Т-2 токсина в стандартном растворе составляет 100 нг/мкл или 100 мкг/мл.

Раствор хранят в холодильнике при температуре не выше +10° С. Срок годности стандартного раствора - до 2 лет.

3.2. Получение ТФА производных.

а) получение ТФА производного стандарта Т-2 токсина.

В мерную пробирку на 5 мл с НШ 14,5 добавляют 50 мкл стандартного раствора Т-2 токсина в бензоле, добавляют 250 мкл бензола, 30-50 мг свежепрокаленного углекислого натрия и 50 мкл трифторуксусного ангидрида. Пробирку плотно закрывают стеклянной притертой пробкой и перемешивают при 20-25° С в течение 0,5 часа на магнитной мешалке (в пробирку предварительно помещают "гвоздик" для перемешивания - кусочек металлической канцелярской скрепки длиной 3-4 мм, запаянный в стеклянный капилляр). Содержимое пробирки разбавляют бензолом до 1 мл и фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в другую пробирку на 5 мл с НШ 14,5, углекислый натрий на фильтре промывают 0,5 мл бензола. Объединенные бензольные фильтраты упаривают досуха в слабой струе азота (при отсутствии баллона с азотом можно упарить досуха на ротационном испарителе). Остаток растворяют в 200 мкл бензола и анализируют с помощью ГЖХ.

б) получение ТФА производных экстракта.

К 300 мкл бензольного раствора очищенного экстракта (раствор Б) добавляют углекислый натрий и трифторуксусный ангидрид и проводят получение ТФА производных аналогично пункту 3.2.а.

3.3. ГЖХ анализ ТФА производных.

Условия ГЖХ анализа: температура колонки - 200°, температура испарителя - 235°, температура термостата детектора - 270°, скорость газа-носителя - 90-100 мл/мин, скорость продувочного газа -190-200 мл/мин, шкала чувствительности - 2 х 10^{-12}А (на блоке ИМТ).

В газовый хроматограф с помощью микрошприца на 1 мкл последова-

тельно вносят 0,2 и 0,5 мкл (соответствуют 5 и I2,5 нг Т-2 токсина) раствора ТФА-производного стандарта Т-2 токсина в 200 мкл бензола (пункт 3.2.а.). В каждом случае регистрируют время удерживания (в данных условиях порядка 5-6 минут) и определяют площадь пика ТФА Т-2 токсина ($S_{ст}$). Площадь пика определяют умножением высоты пика на ширину пика на половине его высоты. Затем в газовый хроматограф вносят 0,5-I,0 мкл раствора ТФА производного экстракта (пункт 3.2.б.). При наличии пика, соответствующего по времени удерживания ТФА производного Т-2 токсина, определяют его площадь ($S_{обр}$).

Содержание Т-2 токсина в исходном образце определяют по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot T_3 \cdot S_{обр} \cdot m_{ст}}{V_2 \cdot T_4 \cdot S_{ст} \cdot M} \quad \text{(мкг/кг), где}$$

$S_{обр}$ - площадь пика ТФА производного Т-2 токсина в экстракте, в $мм^2$;

$S_{ст}$ - площадь пика ТФА производного стандарта Т-2 токсина, в $мм^2$;

$m_{ст}$ - масса стандарта Т-2 токсина, внесенная в хроматограф, в нг (5 или I2,5 нг);

M - масса исходного образца, в г (20 г);

V_1 - объем экстрагирующего растворителя, в мл (I00 мл); бензол

V_2 - объем фильтрата, взятый для анализа, в мл (70 мл);

V_3 - объем бензольного раствора ТФА производного экстракта, в мкл (200 мкл);

V_4 - объем бензольного раствора ТФА производного экстракта, вне - внесенный в хроматограф, в мкл.

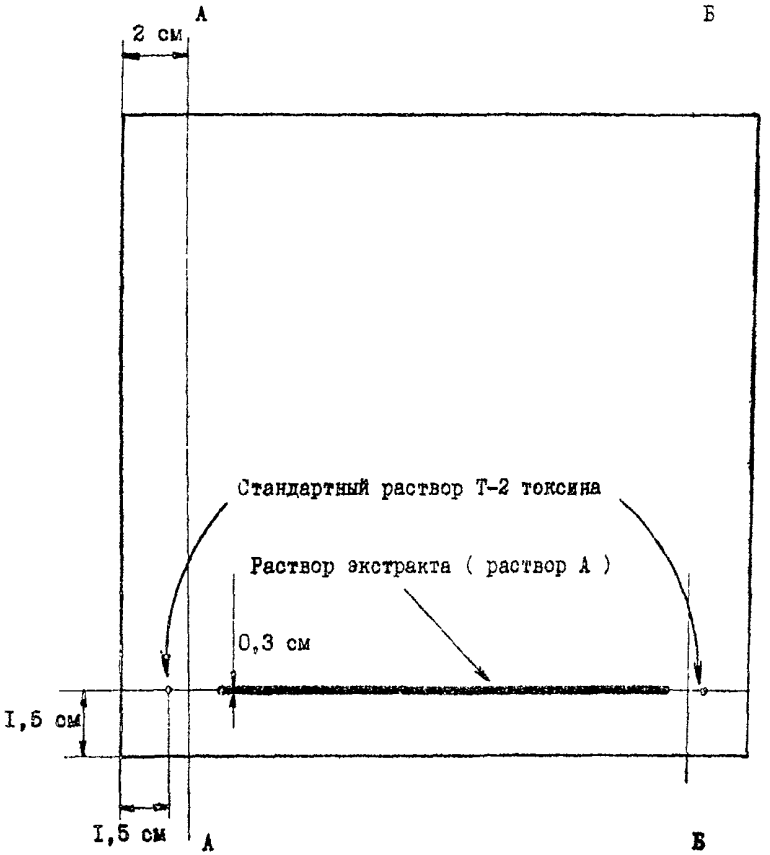

А
Б
2 см
Стандартный раствор Т-2 токсина
Раствор экстракта (раствор А)
0,3 см
I,5 см
I,5 см
А
Б

Рис. I.

_____

(полное наименование

_____

организации, где за-

_____

полняется карта)

Заполненная карта направляется по адресу: 109240, Москва, Устьинский проезд, 2/14
Институт питания АМН СССР, научно-организационный отдел.

КАРТА ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

К "Методическим указаниям по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье".

1. Принято к внедрению в практику санэпидслужб (где и когда)_____

_____

_____

2. Полученный положительный эффект (проведены анализы на содержание Т-2 токсина, получены конкретные данные)_____

_____

_____

3. Материалы не могут быть использованы по следующим причинам (указать причины) _____

_____

_____

4. Ваши замечания и пожелания_____

_____

_____

_____

Подпись

Должность

Ротапринт, г. Джамбул, тип. № 13, зак. 4477-1000/8

gost.e-ecolog.ru