МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА (ВОМИТОКСИНА) И ЗЕАРАЛЕНОНА В ЗЕРНЕ И ЗЕРНОПРОДУКТАХ

МОСКВА - 1990 г.

gost.e-ecolog.ru

Методические указания предназначены для лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и НИИ гигиенического профиля при контроле за загрязнением зерна и зернопродуктов фузариотоксинами: дезоксиниваленолом вомитоксином) и зеараленоном вместо действующих ранее "Методических указаний по обнарухению, идентификации и определению содерхания дезоксиниваленола (вомитоксина) в зерне и зернопродуктах" No 3940-85 и "Методических-рекомендаций по обнарухению, идентификации и определению содерхания зеараленона в пищевых продуктах" No 2964-84.

Разработаны в отделе гигиены питания Института питания АМН-СССР: рук. отдела, профессор Тутельян В.А., рук. лаборатории гигиенических исследований импортируемых пищевых продуктов, кандидат химических наук Эллер К.И., старший научный сотрудник, кандидат биологических наук Пименова В.В., младший научный сотрудник Музыченко Н.И., старший научный сотрудник лаборатории энзимологии питания, кандидат биологических наук Соболев В.С, старший лаборант Захарова Л.П.

"УТВЕРЖДАЮ"
Начальник Главного
санитарно-профилактического
управления Минздрава СССР
_____ЧИБУРАЕВ В.И.

"27" июня 1990 г. N°5177-90

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА (ВОМИТОКСИНА) И ЗЕАРАЛЕНОНА В ЗЕРНЕ И ЗЕРНОПРОДУКТАХ

Дезоксиниваленол и зеараленон являются микотоксинами, наиболее часто продуцируемыми широко распространенными микроскопическими грибами рода Fusarium (Fusarium graminearum, F.culmorum, F.roseum и др.), поражающими зерновые в ряде регионов страны.

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.

В СССР установлена временная ПДК на содержание дезоксиниваленола в продовольственном заготавливаемом зерне на уровне 1,0 мг/кг - в сильных и твердых сортах пшеницы и на уровне 0.5 мг/кг - в остальной пшенице ("Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов", Минздрав СССР, 1989), в переработанном зерне - на уровне не выше 0,5 мг/кг.

Дезоксиниваленол - бесцветное кристаллическое вещество с молекулярной массой 296 а.е.м., имеет слабо выраженный максимум поглощения УФ-света при длине волны 219 нм (ϵ 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 (ТСХ) производят по специфической флуоресценции после обработки раствором хлорида алюминия.

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

В СССР установлена ПДК на содержание зеараленона в зерновых на уровне 1мг/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 (ε 29700), 274 нм (ε 13909) и 316 нм (ε 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.

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 или с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на силикагеле с УФ-детектором 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 флуори-

метрическим 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.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С по ТУ 64-1-2451-78 или аналогичный.
2. Ротационный испаритель ИР-1М по ТУ 25-11-917-76 (завод "Химлабприбор") с ловушкой или аналогичный испаритель.
3. Мельница лабораторная электрическая ЭМ-3А по ТУ 46-22-236-79 или аналогичная.
4. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) ТУ 64-1-1080-78 или диагностическая лампа ОЛД-41 или "Люминоскоп" ЛПК-1.
5. 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 25 см, предколонки - 4,5 см, внутренний диаметр - 4,6 мм.
6. Микрошприцы МШ-10 на 10 мкл, микрошприцы на 10 или 25 мкл для ВЭЖХ.
7. Стеклянные камеры для ТСХ с притертыми крышками.
8. Пластинки для ТСХ "Силуфол" размером 15х15 см или 20х20 см, производство ЧСФР.
9. Колбы плоскодонные конические 250 мл, НШ 29, тип КнКШ 250-29/32, ГОСТ 10394-74.
10. Колбы грушевидные на 100 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23 по ГОСТ 10394-74.

11.Колбы грушевидные на 10-20 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23 по ГОСТ 10394-74;

12.Колбы мерные на 100 мл, тип 2-100-2 по ГОСТ 1770-74.

13.Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 по ГОСТ 1770-74.

14.Воронки делительные ВД2-250 по ГОСТ 8613-75.

15.Колонка стеклянная хроматографическая 220х15 мм.

16.Распылитель стеклянный с грушей.

17.Стандартные растворы дезоксиниваленола в этилацетате с концентрацией 25 нг/мкл, стандартный раствор зеараленона в бензоле с концентрацией 10 нг/мкл.

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 или гептан "чда" по ГОСТ 5.395-70.

22.Изопропиловый спирт (пропанол-2) "хч" по ТУ 6-09-1710-77.

23.Кислота уксусная "чда" по ГОСТ 61-75.

24.Кислота муравьиная "ч" по ГОСТ 5848-73.

25.Метанол "чда" по ГОСТ 6995-77.

26.Толуол "чда" по ГОСТ 5789-78.

27.Хлороформ для наркоза или по ГОСТ 3610-51.

28.Этанол по ТУ 6-09-1710-77.

29.Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) "чда" по ГОСТ 22300-76.

30.Эфир диэтиловый по ГОСТ 6265-52.

31.Эфир петролейный (т.кип. 40-70°С) по ТУ 6-02-1244-83.

32.Алюминий оксид нейтральный для хроматорафии по Брокману 11,"Реанал",(Венгрия) N° 01125 или алюминий оксид для хроматографии по ТУ 6-09-916-75.

33.Алюминий хлористый, 6-водный "чда" по ГОСТ 3759-75.

34.Натрий сернокислый, безводный "чда" по ГОСТ 4166-76.

35.Натрий кислый углекислый "чда" по ГОСТ 83-79.

36.Натрий хлористый "осч" по ТУ 6-09-3658-74.

37.Прочный синий В-соль (диазоль синий С) или прочный фиолетовый В-соль для гистологии, "Хемапол", ЧСФР.

38.Уголь активированный Р.72.270.3.

1. 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.

2. ОБНАРУЖЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА В ЭКСТРАКТЕ

2.1. 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 5 г 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.

2.2. ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА С ПОМОЩЬЮ ОДНОМЕРНОЙ ТСХ.

На пластинке "Силуфол" 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 расстояние 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 R_f 0,25-0,30. 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:

$$C = \frac{V1 \times m}{V2 \times M \times 1000} \text{ мг/кг, где}$$

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;

M - 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.

2.3. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ НАЛИЧИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА С ПОМОЩЬЮ ДВУМЕРНОЙ ТСХ

Пластинку "Силуфол" размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слоя силикагеля, согласно рис.1..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. 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 аналогично п.2.2.

2.4. 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 Е.О.П. Входное напряжение самописца 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 мин. 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:

$$C = \frac{V1 \times m \times h\,обр.}{V2 \times M \times 1000 \times hст.}\ мг/кг,$$ где

V1 - объем раствора А, 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);

hст. - высота пика, соответствующая данной массе стандарта, в мм;

hобр.- высота пика дезоксиниваленола из образца, в мм.

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

3. ОБНАРУЖЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЗЕАРАЛЕНОНА

3.1. 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 упаривают в грушевидной колбе на 100 мл на ротационном испарите-

ле 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.

3.2. ОБНАРУЖЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЗЕАРАЛЕНОНА С ПОМОЩЬЮ ОДНОМЕРНОЙ ТСХ

На пластинке "Силуфол" проводят тонкую карандашную линию на расстоянии 12 мм 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 "Силуфол". Обе пластинки помещают в камеру для ТСХ и элюируют в системе гексан-ацетон (7:3). Пластинки извлекают, сушат на воздухе 3-4 мин.

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.

3.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗЕАРАЛЕНОНА С ПОМОЩЬЮ ДВУМЕРНОЙ ТСХ

Пластинку "Силуфол" размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слоя силикагеля, согласно рис.2. 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, 10 и 20 мкл раствора В; 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 мин. 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 п. 3.2. 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:

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

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 ТСХ (раствор В) в мкл (500 мкл);

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

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

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

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

$$C = 0{,}0025\ m \text{ мг/кг.}$$

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.

3.4. 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 (Т°кип. 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. Шкала самописца 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 мин.

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:

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

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 ВЭЖХ (раствор В) в мкл (500 мкл);

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

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

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

hст. - высота пика, соответствующая данной массе стандарта, в мм;

hобр.- высота пика зеараленона из образца в мм.

Если пик зеараленона в образце выходит за пределы шкалы самописца, анализ проводят повторно после разбавления раствора В бензолом, т.е. 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).

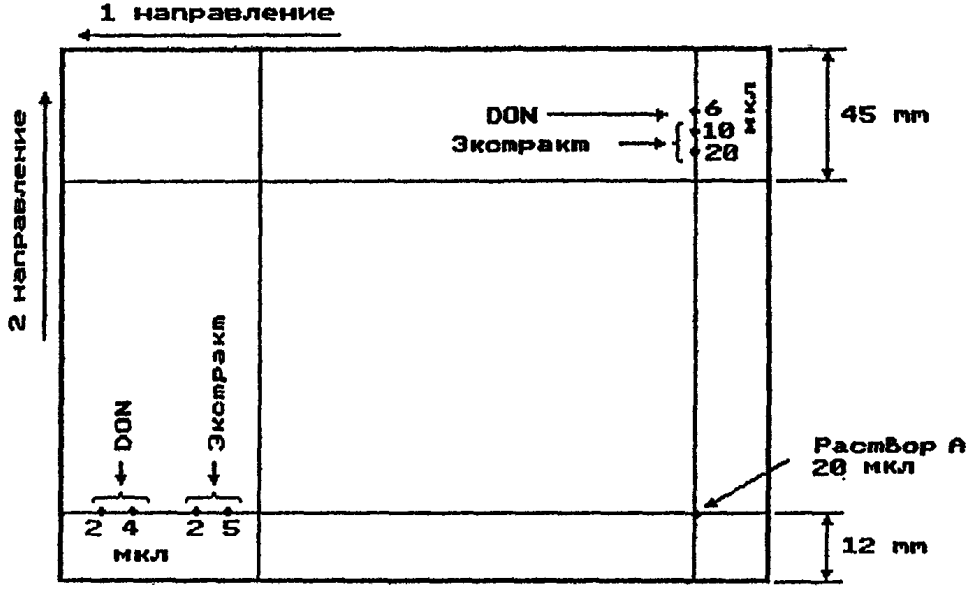

Рис. 1. Разметка пластинки для двумерной ТСХ дезоксиниваленола .

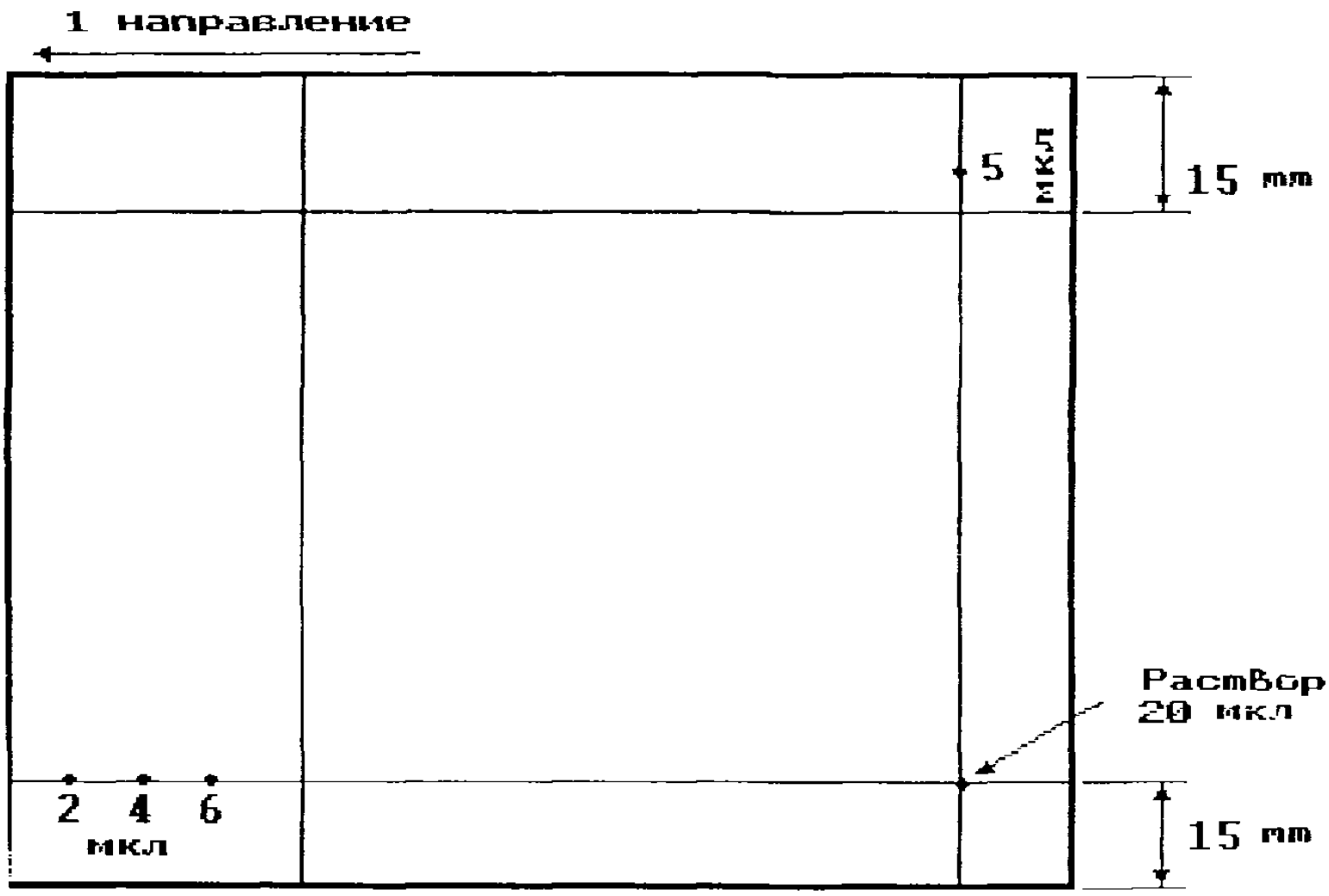

Рис. 2. Разметка пластинки для двумерной ТСХ зеараленона.

gost.e-ecolog.ru