МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЗЕРНО ФУРАЖНОЕ, ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ, КОМБИКОРМА

Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона (Ф-2) и охратоксина А

ГОСТ 28001—88

Fodder grain, products of its processing, mixed feeds.
Methods for determination of micotoxins:
T-2 toxin, zearalenon (F-2) and ochratoxin A

ОКСТУ 9209

Дата введения 01.01.90

Настоящий стандарт распространяется на фуражное зерно, продукты его переработки и все виды комбикормов и устанавливает методы определения токсинов Т-2, зеараленона (Ф-2) и охратоксина А.

Стандарт применяют в ветеринарных лабораториях Госагропрома СССР.

1. ОТБОР ПРОБ

Отбор проб — по ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 20239, ГОСТ 12430.

2. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ Т-2 ТОКСИНА В ФУРАЖНОМ ЗЕРНЕ

Сущность метода заключается в извлечении токсина ацетоном, очистке экстракта от липидов и растительных пигментов с последующей доочисткой на хроматографической колонке и двукратном хроматографировании его на пластинке «Силуфол» со стандартным раствором токсина. Чувствительность метода — 600 мкг/кг кормового средства.

2.1. **Аппаратура, материалы и реактивы**

Шуттель-аппарат.

Баня водяная, электрическая (2—4-гнездная).

Весы аналитические марки АДВ-200.

Весы лабораторные 2-го класса точности по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Мельница лабораторная электрическая.

Источник ультрафиолетовых лучей с длиной волны 365 нм марки ОИ-18, ВИО-1 или других аналогичных марок.

Микрошприц вместимостью 0,01 $см^3$.

Шкаф сушильный.

Набор сит.

Испаритель роторный.

Распылитель стеклянный (пульверизатор).

Холодильник.

Электрофен бытовой по ГОСТ 22314.

Мельница шаровая.

Эксикатор диаметром 29 см.

Штатив Бунзена.

Штатив для пробирок.

gost.e-ecolog.ru

Пробирки стеклянные мерные с притертой пробкой вместимостью 5 и 10 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Пробирки центрифужные вместимостью 10 $см^3$.

Воронки стеклянные диаметром 4, 6, 8 см по ГОСТ 25336.

Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 500 и 250 $см^3$.

Колбы мерные исполнений 1 и 2 вместимостью 25, 50, 100 $см^3$ 2-го класса точности по ГОСТ 1770.

Воронки делительные типа ВД, исполнений 1—3, вместимостью 500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5 вместимостью 1, 2 и 10 $см^3$ 2-го класса точности по нормативно-технической документации.

Цилиндры мерные вместимостью 25, 50 и 100 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Чашки фарфоровые диаметром 15 см по ГОСТ 9147.

Колонка хроматографическая диаметром 1,8 см, высотой 18—20 см.

Пластинки хроматографические «Силуфол» с флюоресцентным слоем марки ИУ-254, размером 15×15 см.

Камера хроматографическая.

Бумага лабораторная фильтровальная по ГОСТ 7584.

Алюминия окись для хроматографии, 2-й степени активности по Брокману, ч.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч. д. а.

Гексан, х. ч.

Кальция окись по ГОСТ 8677, х. ч.

Кальций хлористый плавленый, ч.

Кислота азотная по ГОСТ 4461, х. ч.

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, х. ч.

Кислота уксусная, ледяная по ГОСТ 61, х. ч.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч.

Серебро азотно-кислое по ГОСТ 1277, ч. д. а.

Силикагель марки КСК.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.

Хлороформ для наркоза по ГОСТ 20015.

Этилацетат по ГОСТ 22300, ч.

Стандарт микотоксина Т-2.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

2.2. **Подготовка к испытанию**

2.2.1. Подготовка проб к испытанию

Из средней пробы фуражного зерна методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 100 г, которую размалывают на электромельнице до такого состояния, чтобы она проходила без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Подготовленную для испытания пробу хранят в стеклянной колбе с крышкой в сухом темном месте.

2.2.2. Подготовка хроматографической колонки

Хроматографическую колонку заполняют в следующей последовательности: вначале помещают тампон гигроскопической ваты, затем 1 г силикагеля, 2 г окиси алюминия и 2 г окиси кальция. Силикагель и окись алюминия вносят небольшими порциями, слегка постукивая по колонке. Для удаления пузырьков воздуха промывают колонку небольшим количеством хлороформа (15—20 см) при отсасывании водоструйным насосом. Окись кальция вносят в колонку в виде хлороформной суспензии при отсасывании водоструйным насосом.

2.2.3. Приготовление растворов и реактивов

2.2.3.1. *Приготовление 20 %-ного спиртового раствора серной кислоты*

11,5 $см^3$ серной кислоты небольшими порциями, при осторожном перемешивании, переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ с небольшим количеством этилового спирта (15—20 см). После охлаждения раствора постепенно, при постоянном перемешивании, добавляют в колбу этиловый спирт до метки. Охлаждают при комнатной температуре и окончательно доводят раствор в колбе спиртом до метки.

2.2.3.2. *Приготовление системы растворителей*

Растворитель 1. Гексан смешивают с этилацетатом в соотношении 1:1. Высота слоя налитой в хроматографическую камеру жидкости не должна превышать 0,5 см;

Растворитель 2. Толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6:3:1 или хлороформ смешивают с этилацетатом и уксусной ледяной кислотой в соотношении 17:3:1.

2.2.3.3. *Приготовление водного раствора азотно-кислого серебра с массовой долей 2 %*

1 г азотно-кислого серебра помещают в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, добавляют дистиллированную воду до метки. Раствор хранят в холодильнике.

2.2.3.4. *Приготовление силикагеля*

Силикагель размалывают на шаровой мельнице и заливают на 18—20 ч соляной кислотой, разбавленной водой 1:1. Затем кислоту сливают и силикагель промывают водой до отсутствия в промывных водах следов иона хлора. Для этого к 1 $см^3$ промывных вод прибавляют 1 $см^3$ раствора азотно-кислого серебра с массовой долей 2 % и 1 $см^3$ азотной кислоты. В присутствии иона хлора выпадает осадок белого цвета. Затем силикагель промывают ацетоном, просушивают под тягой до исчезновения запаха ацетона и высушивают в сушильном шкафу при температуре 130 °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 0,105 мм и задерживающуюся на сите — 0,075 мм. Силикагель хранят в плотно закрытых сосудах.

2.2.3.5. *Подготовка окиси кальция, силикагеля и пластинки «Силуфол»*

Окись кальция, силикагель и пластинки «Силуфол» перед использованием активируют нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 1 ч. Окись кальция предварительно растирают в фарфоровой ступке.

2.2.3.6. *Приготовление стандартного раствора микотоксина Т-2*

Взвешивают в стаканчике вместимостью 25 $см^3$ 0,0250 г (точная навеска) кристаллического микотоксина Т-2, переносят с помощью этилового спирта или ацетона в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ и доводят объем раствора спиртом или ацетоном до метки. В 1 $см^3$ раствора содержится 0,5 мг Т-2 токсина. Раствор устойчив в течение 3 мес при хранении на холоде.

2.3. **Проведение испытания**

2.3.1. Из подготовленной для испытания пробы зерна отбирают навеску массой 25 г и помещают в колбу вместимостью 500 $см^3$. В колбу вносят 150 $см^3$ ацетона и встряхивают на шуттель-аппарате 1,5 ч (либо оставляют на 18—20 ч при комнатной температуре). Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в колбу, а остаток корма еще раз заливают 100 $см^3$ ацетона, вновь встряхивают 30 мин и фильтруют через тот же фильтр в соответствующую колбу. Фильтр промывают 10 $см^3$ ацетона, присоединяя фильтрат к общему ацетоновому экстракту, который переносят в делительную воронку. К ацетоновому экстракту добавляют 25 $см^3$ гексана, перемешивают и добавляют 50 $см^3$ воды. После разделения слоев гексановую фракцию (верхний слой) удаляют, а нижний слой (водно-ацетоновая фракция) повторно экстрагируют 25 $см^3$ гексана при перемешивании растворов. Выделившийся после отстаивания смеси верхний гексановый слой снова удаляют.

2.3.2. Водно-ацетоновую фракцию экстрагируют 25 $см^3$ хлороформа. Содержимое перемешивают 2 мин и оставляют для разделения слоев. После разделения слоев хлороформную фракцию (нижний слой) собирают в отдельную колбу, а затем пропускают через подготовленную хроматографическую колонку. Очищенный на колонке от примесей экстракт собирают в колбу для отгона или выпарительную чашку. Экстракцию водно-ацетоновой фракции хлороформом проводят еще два раза, экстрагируя каждый раз 20 $см^3$ хлороформа и пропуская каждую порцию экстракта через хроматографическую колонку. Экстракты, очищенные на колонке, собирают вместе в колбе для отгона или выпарительной чашке. Затем колонку три раза промывают хлороформом по 30 $см^3$ с последующим присоединением промывных порций к основному экстракту, находящемуся в колбе для отгона.

2.3.3. Колбу для отгона соединяют с перегонным аппаратом или роторным испарителем и содержимое ее концентрируют на кипящей водяной бане до 3 $см^3$. При использовании выпарительной чашки раствор упаривают также на кипящей водяной бане до 2—3 $см^3$. Концентрированный хлороформный экстракт переносят в центрифужную пробирку. Колбу трехкратно ополаскивают 1—1,5 $см^3$ хлороформа, присоединяя эти порции к основному раствору в пробирке. Пробирку нагревают на водяной бане до полного удаления хлороформа. Нагревание ведут

вначале при температуре 80—85 °С, а затем по мере уменьшения объема раствора температуру снижают до 60 °С.

2.3.4. Остаток в пробирке растворяют в 0,1 см^3 ацетона и наносят микрошприцем на стартовую линию хроматографической пластинки «Силуфол». Пробы наносят по 0,01 см^3 на расстоянии 1,5 см друг от друга и нижнего края пластинки. Одновременно с исследуемыми растворами на пластинку наносят 0,002 см^3 стандартного спиртового или ацетонового раствора токсина Т-2. Пластинку с нанесенными пробами помещают в насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру таким образом, чтобы стартовая линия располагалась на 0,5 см выше уровня подвижного растворителя. Первое хроматографирование проводят в системе этилацетат — гексан (1:1). Когда фронт растворителя продвинется на высоту 14,5 см от нижнего края пластинки, хроматограмму извлекают из камеры, 5—7 мин подсушивают на воздухе, а затем 1—2 мин в сушильном шкафу при температуре 100 °С. После высушивания хроматограмму повторно помещают в камеру с системой растворителей хлороформ — этилацетат — уксусная кислота (17:3:1) или толуол — этилацетат — муравьиная кислота (6:3:1).Когда фронт смеси растворителей продвинется на высоту 14,5 см, хроматограмму извлекают из камеры, подсушивают на воздухе, обрабатывают 20 %-ным спиртовым раствором серной кислоты из пульверизатора и помещают в сушильный шкаф с температурой 110 °С. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу 3—5 мин до небольшого потемнения. После этого пластинку извлекают из шкафа, охлаждают и просматривают в ультрафиолетовых лучах длиной 365 нм.

2.4. **Обработка результатов**

Токсин Т-2 на хроматограмме в исследуемой пробе обнаруживают в виде пятна с голубой флюоресценцией, соответствующей по положению и флюоресценции пятну токсина Т-2 в стандартной пробе. При использовании в повторном хроматографировании системы толуол — этилацетат — муравьиная кислота (6:3:1) *Rf* токсина Т-2 составляет 0,23—0,24, при применении системы хлороформ — этилацетат — уксусная кислота (17:3:1) — 0,20—0,23.

Результат считается положительным на наличие токсина Т-2 при обнаружении голубой флюоресценции на пластинке «Силуфол» в исследуемой пробе, соответствующей по положению флюоресценции пятну стандартного раствора Т-2 токсина хотя бы в одной из двух параллельных проб.

3. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЗЕАРАЛЕНОНА (Ф-2) В ФУРАЖНОМ ЗЕРНЕ, ПРОДУКТАХ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОМБИКОРМАХ

Сущность метода заключается в экстракции зеараленона (Ф-2) из кормов смесью ацетонитрила и раствора хлористого калия, его очистке и хроматографировании на пластинках «Силуфол» с последующим измерением интенсивности флюоресценции или интенсивности его окрашивания красным прочным ЖЖ в сравнении со стандартным раствором зеараленона. Чувствительность метода 50 мкг/кг кормового средства.

3.1. **Аппаратура, материалы и реактивы**

Мельница лабораторная электрическая.

Весы лабораторные 2-го класса точности по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Весы аналитические марки АДВ-200.

Насос водоструйный.

Испаритель роторный.

Баня водяная электрическая (2—4-гнездная).

Источник ультрафиолетовых лучей длиной волны 253 нм марки ВИО-1, или других аналогичных марок или хроматоскоп.

Шуттель-аппарат.

Набор сит.

Микрошприц вместимостью 0,01 см^3.

Распылитель стеклянный (пульверизатор).

Шкаф сушильный.

Электрофен бытовой ГОСТ 22314.

Холодильник.

Штатив Бунзена.

Штатив для пробирок.

Бумага лабораторная фильтровальная по ГОСТ 7584.

Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 500 $см^3$.

Воронки делительные типа ВД, исполнений 1—3, вместимостью 250—500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Силикагель АСК.

Пробирки стеклянные мерные с притертой пробкой вместимостью 5—10 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Пластинки хроматографические «Силуфол» с флюоресцентным слоем марки ИУ-254, размером 15 × 15 см и 20 × 20 см.

Цилиндры мерные вместимостью 10, 50, 100, 250 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Камера хроматографическая.

Чашки выпарительные фарфоровые на 8 и 15 см.

Пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5 вместимостью 1, 2, 10 $см^3$ 2-го класса точности по нормативно-технической документации.

Колбы мерные исполнений 1, 2 вместимостью 25, 50, 100, 500, 1000 $см^3$ 2-го класса точности по ГОСТ 1770.

Воронки стеклянные диаметром 6 см по ГОСТ 25336.

Гексан, х. ч.

Ацетонитрил, ч.

Хлороформ для наркоза по ГОСТ 20015.

Бензол по ГОСТ 5955, х. ч.

Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.

Этилацетат по ГОСТ 22300, ч.

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Свинец уксуснокислый по ГОСТ 4166, ч. д. а.

Силикагель АСК по ГОСТ 3956.

Муравьиная кислота по ГОСТ 5848, ч. д. а.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, с массовой долей 50 %.

Диатомовая земля (целит 545).

Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х. ч.

Красный прочный ЖЖ (п-нитрофенилдиазония тетрафторборат, стабилизированная соль).

Стандарт зеараленона (Ф-2).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

3.2. **Подготовка к испытанию**

3.2.1. Подготовка проб к испытанию

Из средней пробы фуражного зерна или продуктов его переработки и комбикормов методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 150 г, которую размалывают на электромельнице до такого состояния, чтобы она проходила без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Подготовленную для испытания пробу хранят в стеклянной колбе с крышкой в темном месте.

3.2.2. Приготовление растворов и реактивов

3.2.2.1. *Приготовление раствора хлористого калия с массовой долей 4 %*

4 г хлористого калия вносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и растворяют в воде, после чего воду доливают до метки.

3.2.2.2. *Приготовление раствора уксуснокислого свинца*

200 г уксуснокислого свинца помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, заливают 3 $см^3$ уксусной кислоты и разбавляют водой до метки.

3.2.2.3. *Приготовление раствора красного прочного ЖЖ с массовой долей 0,05 %*

12,5 мг красного прочного ЖЖ вносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ и растворяют в 50 %-ном этиловом спирте. После растворения этим же растворителем доводят объем раствора до метки. Раствор готовят перед применением.

3.2.2.4. *Приготовление системы подвижных растворителей*

Растворитель 1. Толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6:3:1.

Растворитель 2. Бензол смешивают с ацетонитрилом в соотношении 98:2.

3.2.2.5. *Приготовление стандартного раствора зеараленона*

В мерную колбу вместимостью 10 $см^3$ вносят 1 мг зеараленона, растворяют в бензоле и доводят объем до метки. Массовая концентрация раствора микотоксина должна составить 100 $мкг/см^3$. Для приготовления стандартного рабочего раствора берут 1 $см^3$ приготовленного раствора, переносят в мерную колбу вместимостью 10 $см^3$, доводят объем раствора бензолом до метки и получают массовую концентрацию зеараленона 10 $мкг/см^3$. Растворы устойчивы к использованию в течение 6 мес при хранении в темном холодном месте.

3.3. **Проведение испытания**

3.3.1. Из размолотой средней пробы корма берут навеску массой 50 г с погрешностью не более 0,01 г и помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 500 $см^3$.

Для проведения экстракции в колбу с навеской вносят 180 $см^3$ ацетонитрила, 20 $см^3$ раствора хлористого калия с массовой долей 4 %. Колбу закрывают пробкой и взбалтывают на шуттельаппарате 30 мин, после чего содержимое фильтруют через фильтровальную бумагу.

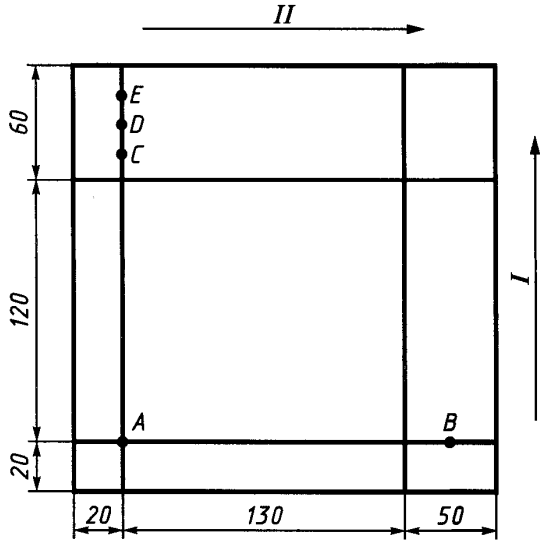
3.3.2. Полученный фильтрат очищают. 100 $см^3$ фильтрата помещают в делительную воронку, где фильтрат четырехкратно обезжиривают гексаном по 50 $см^3$ каждый раз. Очищенную (нижнюю) фазу ацетонитрила переносят либо в колбу роторного испарителя, либо в выпарительную чашку и выпаривают досуха при температуре 80 °С. К полученному сухому остатку добавляют 20 $см^3$ ацетонитрила, 60 $см^3$ воды и 20 $см^3$ раствора уксуснокислого свинца. Перемешивают и ставят в водяную баню на 10—15 мин при температуре 80 °С до образования осадка или помутнения. Затем добавляют 5 г силикагеля АСК (или целита), перемешивают и фильтруют через фильтровальную бумагу. 50 $см^3$ фильтрата помещают в делительную воронку и проводят тройную переэкстракцию хлороформом по 50 $см^3$ каждый раз. Хлороформную фракцию (нижнюю) собирают в выпарительную чашку и упаривают досуха на водяной бане при температуре 80 °С. Сухой остаток растворяют 5 $см^3$ хлороформа, количественно переносят в пробирку с притертой пробкой и упаривают досуха на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 0,5 $см^3$ смеси бензол — ацетонитрил (98:2) и пробирку закрывают плотно пробкой.

3.3.3. Для определения содержания зеараленона проводят одномерную или двухмерную тонкослойную хроматографию на пластинках «Силуфол».

3.3.3.1. Одномерную тонкослойную хроматографию проводят на пластинку размером 15× × 15 см. Отступая на 1,5 см от края пластинки, наносят 0,005; 0,01 и 0,015 $см^3$ стандартного раствора зеараленона и 0,025 $см^3$ растворенного в смеси бензол — ацетонитрил экстракта исследуемой пробы. Разгонку проводят в системе толуол — этилацетат — муравьиная кислота (6:3:1), пластинку просушивают на воздухе и просматривают под источником ультрафиолетовых лучей. По характерному сине-голубому свечению стандартного раствора зеараленона на этом же уровне в хроматограмме определяют наличие таких же пятен и свечения в экстракте исследуемой пробы корма. В случае интенсивного свечения пятен зеараленона в экстракте исследуемой пробы корма, превышающей подобное же свечение в точке нанесения наибольшего количества стандартного раствора зеараленона, в исследуемую пробу дополнительно вносят смесь бензол — ацетонитрил (98:2), доводя объем до 1 $см^3$, 1,5 $см^3$ и т. д. или наносят на пластинку меньшее количество экстракта исследуемой пробы. Для окончательного решения о принадлежности пятен к микотоксину зеараленону хроматограмму орошают из пульверизатора раствором красного прочного ЖЖ и помещают ее в сушильный шкаф при 100—105 °С на 5 мин. Пятна с наличием зеараленона окрашиваются в желтый цвет.

3.3.3.2. Двухмерную тонкослойную хроматографию проводят в случае невозможности достаточной очистки экстрактов или сомнения в результатах исследований при проведении одномерной хроматографии. Для этого используют пластинку «Силуфол» размером 20 × 20 см. Растворы наносят по схеме, указанной на чертеже:

в точке *А* — 0,025 $см^3$ очищенного исследуемого экстракта
в точке *В* — 0,010 $см^3$ стандартного раствора
в точке *С* — 0,005 $см^3$ » »
в точке *D* — 0,010 $см^3$ » »
в точке *Е* — 0,015 $см^3$ » »



I — система бензол — ацетон; *II* — система толуол — этилацетат — муравьиная кислота

Хроматограмму проявляют в системе бензол — ацетон (98:2) в направлении I до уровня, на 1,5—2 см не достигающего точки *С*. Затем ее просушивают и просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 253 нм и возможные пятна зеараленона отмечают карандашом. Затем хроматограмму проявляют в направлении II в системе толуол — этилацетат — муравьиная кислота (6:3:1) до уровня, не достигающего 1,5—2 см точки *В*. Пластинку просушивают, просматривают под ультрафиолетовыми лучами и на уровне стандартного раствора относительно точек *С, D, Е* и точки *В* определяют наличие зеараленона в исследуемой пробе.

3.4. **Обработка результатов**

Содержание зеараленона в пробе (*X*) в миллиграммах на 1 килограмм корма в соответствии с интенсивностью свечения стандартного и испытуемого раствора вычисляют по формуле

$$X = \frac{A \cdot B \cdot D}{12{,}5 \cdot C},$$

где *А* — массовая концентрация зеараленона в стандартном растворе, мкг/см^3;

В — конечный объем экстракта, учитывая возможное разбавление, см^3;

С, D — соответственно объемы экстракта и стандартного раствора зеараленона с одинаковой интенсивностью свечения, см^3;

12,5 — масса пробы корма, соответствующая объему экстракта подвергнутого очистке, г.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

4. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОХРАТОКСИНА А В ФУРАЖНОМ ЗЕРНЕ, ПРОДУКТАХ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОМБИКОРМАХ

Сущность метода заключается в извлечении микотоксина из кормов смесью хлороформа и раствора ортофосфорной кислоты, двойной переэкстракции микотоксина и проведении тонкослойной хроматографии. Чувствительность метода — 10 мкг/кг кормового средства.

4.1. **Аппаратура, материалы и реактивы**

Баня водяная, электрическая (2—4-гнездная).

Весы аналитические марки АДВ-200.

Весы лабораторные 2-го класса точности по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Мельница лабораторная электрическая.

Источник ультрафиолетовых лучей длиной волны 365 нм марки ВИО-1, ОЛД-41, ОИ-18 или других аналогичных марок.

Микрошприц вместимостью 0,01 см^3.

Набор сит.
Распылитель стеклянный (пульверизатор).
Шкаф сушильный.
Холодильник.
Шуттель-аппарат.
Электрофен бытовой по ГОСТ 22314.
pH-метр.
Воронка делительная типа ВД, исполнений 1—3, вместимостью 500 см^3 по ГОСТ 25336.
Штатив Бунзена.
Штатив для пробирок.
Камера хроматографическая.
Пробирки стеклянные мерные с притертой пробкой вместимостью 5 см^3 по ГОСТ 1770.
Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 250 и 500 см^3.
Колбы мерные исполнений 1, 2, вместимостью 1000 см^3, 2-го класса точности по ГОСТ 1770.
Воронки стеклянные диаметром 3, 8 см по ГОСТ 25336.
Цилиндр мерный вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 1770.
Пипетки градуированные, исполнений 1, 2, 4, 5, вместимостью 1 и 10 см^3, 2-го класса точности по нормативно-технической документации.
Чашки фарфоровые выпарительные диаметром 8 см.
Бумага фильтровальная.
Пластинки хроматографические «Силуфол» с флюоресцентным слоем марки ИУ-254, размером 15 × 15 см.
Кислота фосфорная орто по ГОСТ 6552, ч., раствор 0,1 моль/дм^3.
Хлороформ для наркоза по ГОСТ 20015.
Натрий двууглекислый по ГОСТ 2156, ч., раствор 0,1 моль/дм^3.
Бензол по ГОСТ 5955, х. ч.
Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч. д. а.
Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х. ч.
Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.
Этилацетат по ГОСТ 22300, ч.
Аммиак водный по ГОСТ 3760.
Стандарт охратоксина А.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные или лучшие метрологические характеристики.

4.2. **Подготовка к испытанию**

4.2.1. Подготовка проб к испытанию

Из средней пробы фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 150 г, которую размалывают на электромельнице до такого состояния, чтобы она проходила без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Подготовленную для испытания пробу хранят в стеклянной колбе с крышкой в сухом темном месте.

4.2.2. Приготовление растворов и реактивов

4.2.2.1. *Приготовление системы подвижных растворителей*

Толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6:3:1.

4.2.2.2. *Приготовление 0,1 моль/дм^3 раствора ортофосфорной кислоты*

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3, содержащую 500 см^3 дистиллированной воды, вносят 9,8 г (6 см^3) ортофосфорной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора до метки водой.

4.2.2.3. *Приготовление подкисленного раствора хлороформа*

К 10 см^3 хлороформа прибавляют 1 каплю ледяной уксусной кислоты.

4.2.2.4. *Приготовление 0,1 моль/дм^3 раствора двууглекислого натрия*

90,5 г двууглекислого натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, растворяют в воде и доводят объем до метки.

4.2.2.5. *Приготовление стандартного раствора охратоксина А*

5 мг кристаллического охратоксина А растворяют в 5 см^3 подкисленного хлороформа, переносят количественно в мерную колбу на 10 см^3 и доводят объем раствора до метки подкисленным хлороформом. Из полученного раствора берут 0,5 см^3, переносят в мерную колбу на 25 см^3 и доводят объем раствора до метки подкисленным хлороформом. Рабочий стандартный раствор содержит в 1,0 см^3 10 мкг охратоксина А. Раствор хранят в холодильнике.

4.3. **Проведение испытания**

4.3.1. Проводят экстрагирование охратоксина А из комбикорма. Для этого навеску измельченного корма массой 50 г переносят в колбу вместимостью 500 см^3. Заливают 25 см^3 0,1 моль/дм^3 раствора ортофосфорной кислоты и 250 см^3 хлороформа, встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30 мин или экстрагируют путем настаивания в течение 16—18 ч.

4.3.2. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр, переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3, прибавляют к нему 200 см^3 0,1 моль/дм^3 раствора натрия двууглекислого и перемешивают. После разделения смеси хлороформный слой удаляют, а водный остаток подкисляют муравьиной кислотой до pH 2—3 и прибавляют к нему 50 см^3 чистого хлороформа. Содержимое делительной воронки вновь перемешивают. После разделения слоев хлороформный слой сливают в фарфоровую чашку, а водный остаток повторно обрабатывают 50 см^3 хлороформа, который после отделения объединяют с первой порцией и упаривают досуха при температуре не выше 60 °С.

4.3.3. Наличие охратоксина А в корме определяют качественно и полуколичественно.

4.3.3.1. *Качественное определение охратоксина А*

Сухой остаток экстракта растворяют в 1 см^3 подкисленного хлороформа. На хроматографическую пластинку наносят микрошприцем 0,002 см^3 стандартного раствора микотоксина и 0,01 см^3 экстракта исследуемой пробы. Пластинку подсушивают электрофеном. Точки нанесения обоих растворов должны быть на расстоянии не менее 1 см друг от друга и 1,5 см от бокового края пластинки.

Пластинку помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, заполненную системой растворителей толуол — этилацетат — муравьиная кислота (6:3:1). После того, как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают в токе теплого воздуха до удаления запаха растворителей и просматривают под источником ультрафиолетовых лучей с длиной волны 365 нм. Сравнивая зелено-голубое свечение стандартного раствора охратоксина А с характером свечения исследуемой пробы, делают предварительный вывод о наличии или отсутствии в исследуемой пробе корма микотоксина. С целью подтверждения наличия охратоксина А в исследуемой пробе хроматограмму помещают на 5 мин в камеру с парами аммиака, под воздействием которых охратоксин А изменяет флюоресценцию от зелено-голубой до темно-голубой. В случае качественного выявления в исследуемой пробе охратоксина А, проводят полуколичественное определение микотоксина.

4.3.3.2. *Полуколичественное определение содержания охратоксина А*

0,5 см^3 раствора экстракта, используемого для качественного определения, смешивают с 4,5 см^3 хлороформа, перемешивают и наносят на хроматографическую пластинку 0,001, 0,003, 0,005, 0,01 см^3 исследуемого экстракта и 0,002 см^3 стандартного раствора охратоксина А. Просмотром хроматограмм под источником ультрафиолетовых лучей определяют по интенсивности зелено-голубого свечения предельно-минимальное количество охратоксина А в исследуемой пробе. Если на хроматограмме в минимальном объеме исследуемого раствора имеется пятно охратоксина А, превосходящее по интенсивности свечения стандартный раствор охратоксина А, исследуемый раствор разбавляют в 10 и более раз до получения на хроматограмме выявленного свечения охратоксина А.

Содержание охратоксина А в исследуемой пробе (X_1) в микрограммах на 1 кг корма вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{2 \cdot 0{,}001 \cdot W_2 \cdot 1000}{W_1 \cdot M},$$

где W_1 — минимальный объем исследуемого раствора, в котором установлено предельно-выявляемое свечение охратоксина А, см^3;

W_2 — общий объем исследуемого раствора, см^3;

M — масса навески исследуемой пробы, г;

0,001 — минимальное количество охратоксина А, выявляемое на пластинке «Силуфол» под источником УФЛ, мкг;

2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе анализа.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Госагропромом СССР

РАЗРАБОТЧИКИ

В.Г. Иванов, канд. вет. наук (руководитель темы); **А.В. Кушнарев,** канд. вет. наук; **Н.А. Аксенова**

2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 23.12.88 № 4567

3. ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела, пункта
ГОСТ 61—75	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 1277—75	2.1
ГОСТ 1770—74	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 2156—76	4.1
ГОСТ 2603—79	2.1
ГОСТ 3760—79	4.1
ГОСТ 3956—76	3.1
ГОСТ 4166—76	3.1
ГОСТ 4204—77	2.1
ГОСТ 4234—77	3.1
ГОСТ 4461—77	2.1
ГОСТ 5789—78	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 5848—73	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 5955—75	3.1; 4.1
ГОСТ 5962—67	2.1; 3.1
ГОСТ 6552—80	4.1
ГОСТ 6709—72	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 7584—89	2.1; 3.1
ГОСТ 8677—76	2.1
ГОСТ 9147—80	2.1
ГОСТ 12430—66	1
ГОСТ 13496.0—80	1
ГОСТ 13586.3—83	1
ГОСТ 20015—88	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 20239—74	1
ГОСТ 22300—76	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 22314—84	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 24104—88	2.1; 3.1; 4.1
ГОСТ 25336—82	2.1; 3.1; 4.1

5. Ограничение срока действия снято по протоколу № 4—93 Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол 4—94)

6. ПЕРЕИЗДАНИЕ

gost.e-ecolog.ru