

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.

Методические указания предназначены для лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и НИИ гигиенического профиля при контроле за загрязнением зерна и зернопродуктов фузариотоксинами: дезоксциниваленолом (вомитоксином) и зеараленоном вместо действующих ранее "Методических указаний по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксциниваленола (вомитоксина) в зерне и зернопродуктах" № 3940-85 и "Методических рекомендаций по обнаружению, идентификации и определению содержания зеараленона в пищевых продуктах" № 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 Эллэр 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. №5177-90

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

Дезоксениваленол 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.

Дезоксениваленол (вомитоксин) - 3,7,15-тригидрокси-12,13-элокси-трихоте-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 дезоксениваленола 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.

Дезоксениваленол - 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°C. Дезоксениваленол хорошо растворим в воде, спиртах, ацетонитриле, этилацетате, нерастворим в гексане и бензоле. Обнаружение дезоксениваленола при тонкослойной хроматографии (ТСХ) производят по специфической флуоресценции после обработки раствором хлорида алюминия.

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

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.н. 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 образуются интенсивно окрашенные продукты.

Предлагаемый метод определения дезоксинаиваленола и зеараленона в одном образце зерна и зернопродуктов включает следующие этапы:

- экстракцию дезоксинаиваленола и зеараленона из образца смесью ацетонитрила-вода (84:16);
- очистку одной части экстракта на колонке со смесью угля с оксидом алюминия;
- определение дезоксинаиваленола 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 перезэкстракция зеараленона в бензол;
- определение зеараленона с помощью одномерной или двумерной ТСХ с флуори-

метрическим обнаружением после обработки пластинок хлоридом алюминия или с помощью нормальнофазовой ВЭХХ 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 дезоксинаиваленола 0,2 мг/кг (по ТСХ); 0,05 мг/кг (по ВЭХХ);

для зеараленона 0,1 мг/кг (по ТСХ); 0,005 мг/кг (по ВЭХХ);

Относительное стандартное отклонение:

для дезоксинаиваленола 0,25-0,30 (по ТСХ); 0,05-0,09 (по ВЭХХ);

для зеараленона 0,40-0,60 (по ТСХ); 0,06-0,09 (по ВЭХХ).

Степень извлечения добавленных в пробу фузариотоксинов составляет:

80-85% для дезоксинаиваленола и 85-90% для зеараленона.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1. Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-БС 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-ЗА по ТУ 46-22-236-79 или аналогичная.
4. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель В33) ТУ 64-1-1080-78 или диагностическая лампа ОЛД-41 или "Люминоскоп" АПК-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 ВЭХХ.
7. Стеклянные камеры для ТСХ с притертymi крышками.
8. Пластички для ТСХ "Сибуфол" размером 15x15 см или 20x20 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 220x15 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°C) по ТУ 6-02-1244-83.
32. Алюминий оксид нейтральный для хроматографии по Брокману 11, "Реанал", (Венгрия) № 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". Отобранныю 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 пластиинки. На эту линию на расстоянии 2 см друг от друга с помощью

микроширица 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 дезоксиваленола (50, 100 и 150 нг дезоксиваленола). Пластиинку помещают в камеру для ТСХ и засушивают в системе гексан-ацетон (3:2) на расстояние 15 см. Пластиинку извлекают из камеры, сушат на воздухе 3-4 минуты и опрыскивают 10%-ным раствором хлористого алюминия в этаноле. Пластиинку нагревают в сушильном шкафу в течение 5-7 минут при 105°C, затем рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Дезоксиваленол 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 дезоксиваленола, свидетельствует о возможном наличии этого токсина в образце.

Для количественного определения сравнивают интенсивность флуоресценции разных количеств стандартов дезоксиваленола с интенсивностью флуоресценции их пятен в образце, визуально оценивая количество нг токсинов в нанесенных на пластиинку объемах раствора А. Концентрацию дезоксиваленола в образце рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times m}{V_2 \times M \times 1000} \text{ мг/кг, где}$$

V_1 - объем раствора А в мкл (200 мкл);

V_2 - объем раствора А, нанесенный на пластиинку в мкл;

m - масса дезоксиваленола (в нг) в V_2 мкл раствора А, оцененная визуальным сравнением со стандартом на ТСХ-пластиинке;

M - аликвотная навеска образца, соответствующая раствору А (5 г для пшеницы, 3 г для кукурузы).

Если интенсивность флуоресценции пятна дезоксиваленола в экстракте выше интенсивности флуоресценции пятна дезоксиваленола соответствующего 6 мкл стандартного раствора, то следует разбавить раствор А этилацетатом, т.е. увеличить объем V_1 , внеся соответствующие корректизы в расчетную формулу.

Окончательное заключение о наличии и уровне загрязнения образца дезоксиваленолом 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 пластиинки наносят с помощью микроширица 20 мкл раствора А. В левом нижнем углу пластиинки наносят 2, 4 и 6 мкл стандартного раствора дезоксиниваленола, 2 и 5 мкл раствора А. В верхнем правом углу пластиинки наносят 2, 4 и 6 мкл стандартного раствора дезоксиниваленола, 10 и 20 мкл раствора А. Пластиинку 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, пластиинку извлекают из камеры и сушат на воздухе. Затем проводят элюирование пластиинки 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 пластиинки, 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 ВЭХХ.

Условия ВЭХХ: 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 микроширица 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 ВЭХХ 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:

V1 x m x h обр.

C = ----- мг/кг, где

V2 x M x 1000 x hст.

V1 - объем раствора А, мкл (200 мкл);

V2 - объем раствора А, внесенный в хроматограф, в мкл (10 мкл);

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

M - аликовтная 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 дезоксиналенола из образца, в мм.

Если пик дезоксиналенола 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 обезхиренному 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 пластиинки. На эту линию на расстоянии 2 см друг от друга наносят с помощью микроширица 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 пластиинку "Силуфол". Обе пластиинки помещают в камеру для ТСХ и засыпают в системе гексан-акетон (7:3). Пластиинки извлекают, сушат на воздухе 3-4 мин.

Для обнаружения пятен зеараленона на 1-ой пластиинке 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 пластиинке пятен, соответствующих по цвету флуоресценции (синий) и хроматографической подвижности пятнам стандартов зеараленона, свидетельствует о возможном наличии зеараленона в образце.

Для подтверждения наличия зеараленона 2-ю ТСХ-пластиинку опрыскивают 1%-ным раствором прочной синей В-соли или прочной фиолетовой В-соли в дистиллированной воде, затем пластиинку немедленно опрыскивают 5%-ным раствором углекислого натрия до появления красно-бордовой окраски пятен стандарта зеараленона. Обнаружение на пластиинке пятна, соответствующего по цвету и хроматографической подвижности стандартам зеараленона, подтверждает наличие зеараленона в образце.

3.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗЕАРАЛЕНОНА С ПОМОЩЬЮ ДВУМЕРНОЙ ТСХ

Пластиинку "Силуфол" размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слоя силикагеля, согласно рис.2. В правом нижнем углу на расстоянии 12 мм от краев пластиинки наносят с помощью микроширица 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 пластиинки. Пластиинку 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 пластиинки. Пластиинку 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:

$$V1 \times V3 \times m$$

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

$$V2 \times V4 \times M \times 1000$$

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 пластиинку, 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 выражается 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 пластиинку 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 ВЭХХ

Условия ВЭХХ: 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 микрошиприца 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 ВЭХХ 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:

$$V1 \times V3 \times m \times h_{ст.}$$

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

$$V1 - \text{объем водно-ацетонитрильной смеси для экстракции в мл (125 мл);}$$

- 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 ВЭХХ (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;

$h_{ст.}$ - высота пика, соответствующая данной массе стандарта, в мм;

$h_{обр.}$ - 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 ВЭХХ зеараленона чувствительность УФ- и флуориметрического детекторов примерно одинаковы. Преимуществом флуориметрического детектора является его селективность (меньшее количество посторонних пиков на хроматограмме).

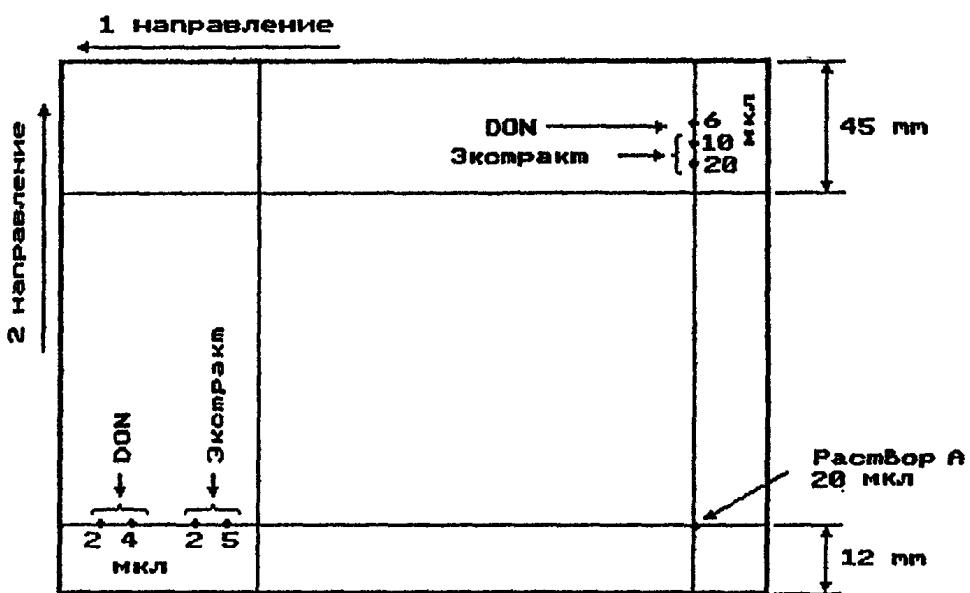


Рис. 1. Разметка пластинки для двумерной ТСХ дезоксиналивола .

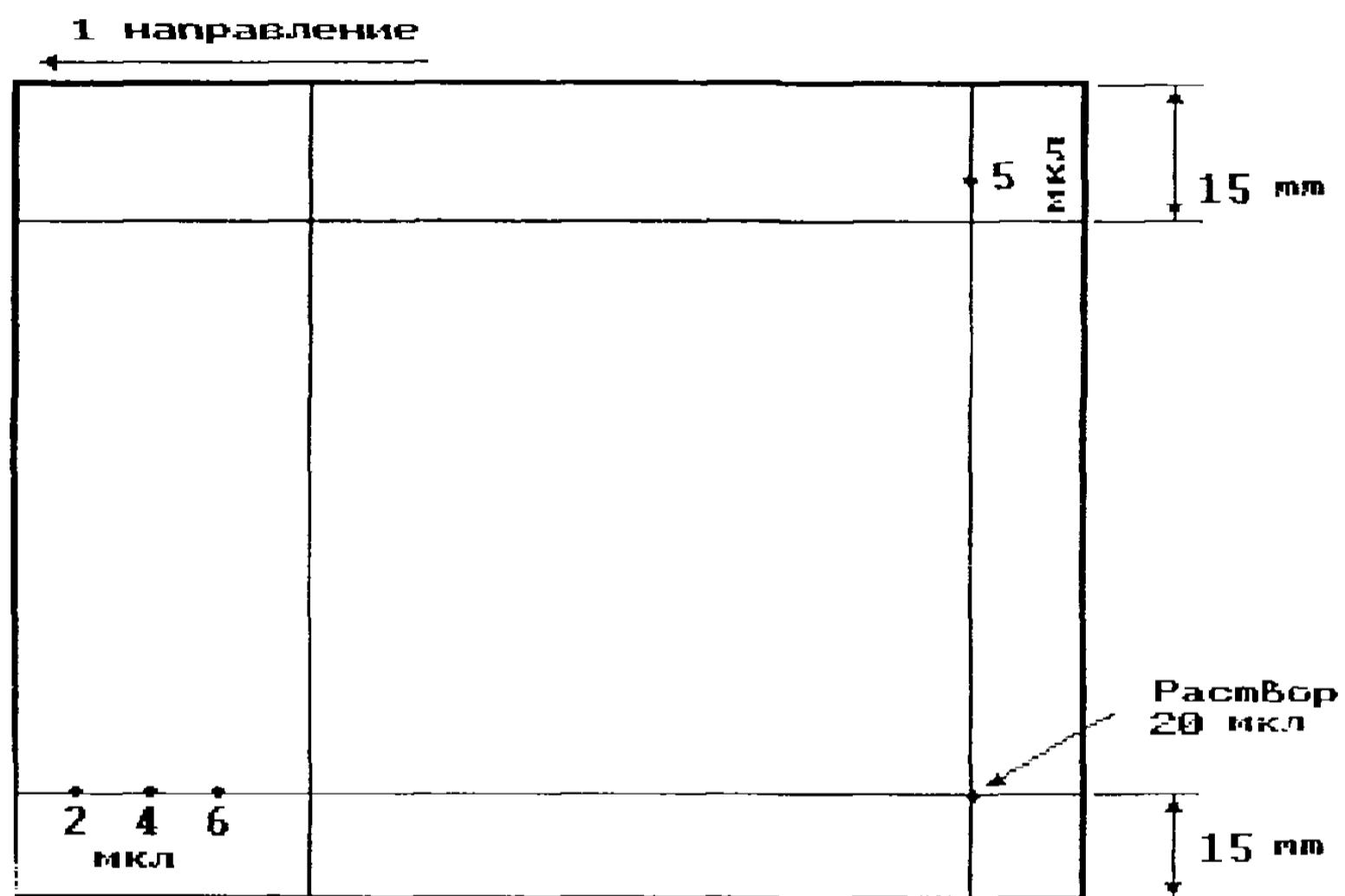


Рис. 2. Разметка пластинки для двумерной ТСХ зонального.