ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57648— 2017

Продукция микробиологическая

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЛАРВИЦИДНЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВ ЛИЧИНОК МУХ

Технические условия

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Ассоциацией «Некоммерческое партнерство Координационно-информационный центр государств — участников СНГ по сближению регуляторных практик» при участии ООО «Центр Промышленной Биотехнологии имени Княгини Е.Р. Дашковой»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 12 сентября 2017 г. № 1049-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.gost.ru)

© Стандартинформ, 2017

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Технические требования . . . 2
4 Требования безопасности . . . 3
5 Правила приемки . . . 4
6 Методы испытаний . . . 4
7 Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение . . . 10
8 Указания по применению . . . 10
9 Гарантии изготовителя . . . 11
Библиография . . . 12

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Продукция микробиологическая

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЛАРВИЦИДНЫЙ ПРЕПАРАТ ПРОТИВ ЛИЧИНОК МУХ

Технические условия

Microbiological products. Bacterial larvicidal drug against fly larvae. Specifications

Дата введения — 2018—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на бактериальный ларвицидный препарат против личинок мух (далее — БЛПМ). Биологический инсектицид БЛПМ предназначен для борьбы с личинками различных видов мух — эктопаразитами животных, а также для борьбы с некоторыми другими насекомыми — паразитами животных и человека, прошедший в установленном порядке государственную регистрацию и включенный в Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению в Российской Федерации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 8.012 Государственная система обеспечения единства измерений. Методы и средства поверки милливольтметров пирометрических

ГОСТ 8.135 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандарт-титры для приготовления буферных растворов — рабочих эталонов pH 2-го и 3-го разрядов. Технические и метрологические характеристики. Методы их определения

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.2.003 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.028—76 Система стандартов безопасности труда. Респираторы ШБ-1 «Лепесток». Технические условия

ГОСТ 12.4.131 Система стандартов безопасности труда. Халаты женские. Технические условия

ГОСТ 12.4.132 Система стандартов безопасности труда. Халаты мужские. Технические условия

ГОСТ 12.4.253—2013 (EN 166:2002) Система стандартов безопасности труда. Средства индивидуальной защиты глаз. Общие технические требования

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3760 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 3769 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 6552 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8433 Вещества вспомогательные ОП-7 и ОП-10. Технические условия

ГОСТ 9097 Сульфат аммония. Технические условия

ГОСТ 11078 Натр едкий очищенный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 14261 Кислота соляная особой чистоты. Технические условия

ГОСТ 20010 Перчатки резиновые технические. Технические условия

ГОСТ 20298 Смолы ионообменные. Катиониты. Технические условия

ГОСТ 20301 Смолы ионообменные. Аниониты. Технические условия

ГОСТ 22967 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—82) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 51574 Соль поваренная пищевая. Технические условия

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 54951 Корма для животных. Определение содержания влаги

ГОСТ Р 57233 Продукция микробиологическая. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 57234 Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

ГОСТ Р 57248 Препараты ферментные. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 57249 Препараты ферментные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется принять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется принять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Технические требования

3.1 Область применения

БЛПМ по характеру проникновения в организм насекомых относится к кишечным инсектицидам, используется в соответствии с методическими указаниями по их применению для борьбы с личинками мух и производится в соответствии с требованиями настоящего стандарта по техническому регламенту, утвержденному в установленном порядке.

3.2 Требования к сырью

Для производства препарата БЛПМ следует использовать следующие виды сырья и вспомогательных материалов:

- фугат культуральной жидкости, содержащий термостабильный экзотоксин;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233 или соль поваренная пищевая по ГОСТ Р 51574, или аммоний сернокислый по ГОСТ 3769, или сульфат аммония по ГОСТ 9097;
- вещества вспомогательные ОП-7 или ОП-10 по ГОСТ 8433.

3.3 Форма выпуска

В зависимости от массовой доли термостабильного экзотоксина БЛПМ выпускают двух марок: В и С.

3.4 По органолептическим, физико-химическим и биологическим параметрам БЛПМ должен соответствовать требованиям таблицы 1.

Таблица 1 — Характеристики препарата БЛПМ

Наименование показателя	Характеристика или норма		Метод испытаний
	Марка В	Марка С	
1 Внешний вид, цвет и запах	Порошок желто-коричневого цвета. Допускается наличие легко растворимых комков		По 6.1
2 Массовая доля влаги, %, не более	8,0		По 6.3
3 Массовая доля нерастворимого в воде сухого остатка, %, не более	23,0	25,0	По 6.4
4 Массовая доля термостабильного экзотоксина, %	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,2	По 6.5
5 Безвредность при пероральном введении белым мышам, при тест-дозе на мышь, мг [1)]	20,0		По 6.7
[1)] Проверяется по требованию потребителя, контролируется организацией и в порядке авторского надзора.			

4 Требования безопасности

4.1 БЛПМ содержит в своем составе остатки питательной среды и различные продукты жизнедеятельности энтомопатогенной бактерии — продуцента.

Препарат продуктивен против личинок насекомых многих видов, но для теплокровных животных по величине острой токсичности ($ЛК_{50}$ не определено) по ГОСТ 12.1.007 относится к веществам 4-го класса опасности по [1] (малоопасное вещество).

Не установлена способность БЛПМ проникать через кожу. Пыль препарата обладает умеренно выраженным аллергенным действием.

4.2 Ориентировочно-безопасный уровень воздействия (ОБУВ) препарата БЛПМ в воздухе рабочей зоны согласно ГОСТ 12.1.005 составляет 1,0 мг/м^3. Препарат не образует токсичных соединений при хранении, а также при контакте с воздухом, водой и под воздействием других веществ.

4.3 БЛПМ взрывобезопасен и пожаробезопасен, не обладает склонностью к накоплению статического электричества с образованием опасных потенциалов. Нижний предел воспламенения препарата 75,3 г/м^3.

4.4 Для предупреждения опасного и вредного воздействия микроорганизмов и продуктов их метаболизма на людей следует соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.008.

4.5 Предприятие-изготовитель должно принимать меры по уменьшению пылевыделения при сушке, стандартизации и фасовке препарата. Производственное оборудование должно отвечать требованиям ГОСТ 12.2.003.

4.6 При изготовлении и применении препарата необходимо использовать спецодежду и индивидуальные средства защиты:

- халаты по ГОСТ 12.4.131 или по ГОСТ 12.4.132;
- перчатки резиновые по ГОСТ 20010 или перчатки хлопчатобумажные;
- респираторы ШБ-1 «Лепесток» по ГОСТ 12.4.028;
- очки защитные по ГОСТ 12.4.253.

4.7 К работе с порошком БЛПМ не допускаются лица с хроническими воспалительными заболеваниями органов дыхания, зрения, кожи, а также лица, склонные к аллергическим реакциям.

Все работники, контактирующие с препаратом, подвергаются периодическим медицинским осмотрам по [2].

4.8 Место попадания БЛПМ на кожу следует промыть теплой водой с мылом.

4.9 Прием пищи и хранение спецодежды лицами, контактирующими с препаратом БЛПМ, следует проводить в специально отведенных для этого помещениях.

4.10 Санитарный контроль за процессами применения БЛПМ проводят в соответствии с наставлением по применению, в котором имеется раздел «Меры предосторожности при работе с препаратом БЛПМ».

5 Правила приемки

Правила приемки препарата БЛПМ — в соответствии с требованиями ГОСТ Р 57233.

В документе о качестве допускается не указывать:

- количество единиц упаковки в партии;
- условия хранения;
- номер смены.

6 Методы испытаний

6.1 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р 57248.

Масса объединенной пробы должна быть не менее 0,3 кг. Допускается объединенную пробу помещать в двойные полиэтиленовые мешочки с последующим их герметичным запаиванием.

6.2 Определение внешнего вида

Определение внешнего вида проводят визуально. В сухой чистый стеклянный стаканчик для взвешивания по ГОСТ 25336 помещают БЛПМ в количестве 4—15 г и рассматривают при дневном или электрическом свете на белом фоне.

6.3 Определение массовой доли влаги

Определение массовой доли влаги проводят по ГОСТ Р 54951 методом высушивания до постоянной массы при температуре 100 °С — 103 °С.

6.4 Определение массовой доли нерастворимого в воде сухого остатка

Методика основана на определении разности масс сухих веществ в нативном растворе БЛПМ и в его центрифугате.

6.4.1 Аппаратура, посуда и реактивы:

- шкаф сушильный электрический марки СШ-4 с точностью поддержания температуры ± 2 °С или других аналогичных марок;
- центрифуга лабораторная со стаканами вместимостью не менее 20 $см^3$ и частотой вращения ротора не менее 6 тыс. об/мин;
- весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ Р 53228 2-го класса точности или других аналогичных марок;
- стаканчики для взвешивания (бюксы) по ГОСТ 25336 или стаканчики металлические диаметром 45—50 мм и высотой 40—50 мм;
- воронки лабораторные по ГОСТ 25336;
- цилиндры мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100 $см^3$;
- палочки стеклянные;
- пипетки химические по ГОСТ 29227 вместимостью 5 $см^3$ с расширенным носиком 1-го или 2-го класса точности;
- вода, дистиллированная по ГОСТ 6709;
- эксикатор по ГОСТ 25336.

6.4.2 Проведение испытания

Навеску препарата 1,8—2,2 г, взвешенную с точностью до третьего десятичного знака, растворяют в 70—80 $см^3$ дистиллированной воды. Тщательно перемешивают раствор стеклянной палочкой, растирая комки в течение 30 мин. Количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки и тщательно перемешивают.

Часть приготовленного раствора БЛПМ (примерно 15—20 $см^3$) подвергают центрифугированию в течение 10 мин на лабораторной центрифуге при 6 — 8 тыс. об/мин для получения прозрачного центрифугата.

Дальнейший анализ на содержание сухих веществ в двух образцах — нативном растворе препарата БЛПМ и прозрачном центрифугате проводят следующим образом. В бюксу, доведенную до постоянной массы, пипеткой с расширенным носиком вносят 5 $см^3$ прозрачного центрифугата. Затем, спо-

лоснув пипетку три раза нативным раствором препарата БЛПМ, вносят 5 см^3 этого раствора в другую бюксу.

В двух бюксах определяют содержание сухого остатка методом высушивания по ГОСТ Р 54951 при температуре 100 °С — 105 °С.

Бюксы с сухим остатком доводят до постоянной массы.

6.4.3 Обработка результатов

Массовую долю нерастворимого в воде сухого остатка X, %, вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \cdot 100, \quad (1)$$

где M_1 — масса сухого остатка нативного раствора БЛПМ, мг;

M_2 — масса сухого остатка прозрачного центрифугата раствора БЛПМ, мг;

100 — коэффициент перевода в проценты.

Вычисления проводят с точностью до 0,1 %. За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, расхождение между которыми не должны превышать 4 % абсолютных. При большем расхождении проводят третье определение и из сходящихся результатов находят среднее арифметическое.

6.5 Определение массовой доли термостабильного экзотоксина спектрофотометрическим методом

Метод основан на частичной очистке термостабильного экзотоксина и его определении по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра.

6.5.1 Аппаратура, посуда, материалы и реактивы:

- УФ-спектрофотометр марки ОФ-16 или аналогичный, позволяющий проводить измерения в области длин волн 230—300 нм;
- весы лабораторные общего назначения по ГОСТ Р 53228 3-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;
- колбы плоскодонные или конические по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см^3 и 100 см^3;
- цилиндры мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3;
- стаканчики для взвешивания (бюксы) по ГОСТ 25336;
- воронки лабораторные по ГОСТ 25336;
- коблы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 25, 100 и 1000 см^3 1-го или 2-го класса точности;
- стандарт-титры для pH-метрии по ГОСТ 8.135;
- пробирки химические по ГОСТ 25336 типа П1 или П2;
- штатив для пробирок;
- фильтры бумажные беззольные с красной полосой по ГОСТ 12026;
- пипетки химические с делениями по ГОСТ 29227 вместимостью 1 см^3 и 5 см^3 1-го или 2-го класса точности;
- универсальная индикаторная бумага pH = 1 — 10 по [3];
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709;
- смола ионообменная-катионит по ГОСТ 20298 марки КУ-2×8;
- аммиак водный по ГОСТ 3760;
- кальций хлористый (обезвоженный), чистый по [4];
- кислота соляная по ГОСТ 3118;
- центрифуга лабораторная вместимостью стаканов 25—50 см^3 и частотой вращения ротора не менее 5 тыс. об/мин.

6.5.2 Подготовка к испытанию

6.5.2.1 Приготовление вспомогательных растворов

20 %-ный раствор хлорида кальция готовят, растворяя 20,0 г его в 80,0 см^3 дистиллированной воды.

Фосфатный буфер для pH-метрии готовят из фиксанала, содержащего 0,025 моль KH_2PO_4 и 0,025 моль Na_2HP_4, растворяя содержимое ампулы в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 и pH = 6,86. Раствор аммиака концентрации 4 моль/дм^3 (4М) готовят, растворяя в мерной колбе вместимостью 100 см^3 30 см^3 концентрированного водного аммиака.

Раствор соляной кислоты концентрации 4 моль/дм^3 (4М) готовят, растворяя в мерной колбе вместимостью 100 см^3 32 см^3 концентрированной соляной кислоты.

6.5.2.2 Приготовление испытуемого раствора БЛПМ

0,23—0,28 г БЛПМ, взвешенного с точностью до четвертого десятичного знака, растворяют в 25 см^3 дистиллированной воды в колбе вместимостью 50 см^3. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой в течение 5 мин, растирая все комки. Добавляют по каплям 4М-раствор соляной кислоты до pH = 1,5—3,0 (по бумажке универсального индикатора) и продолжают перемешивание еще 5 мин.

Мутный раствор БЛПМ центрифугируют 10 мин при 5—8 тыс. об/мин с целью получения прозрачного центрифугата, который собирают в чистую колбу вместимостью 100 см^3. Осадок непосредственно в центрифужной пробирке ресуспергируют в 5 см^3 дистиллированной воды, подкисленной до pH = 1,5—3,0, перемешивают 5 мин и снова центрифугируют в том же режиме. Промывные воды объединяют с ранее полученным центрифугатом, а осадок отбрасывают.

6.5.2.3 Очистка термостабильного экзотоксина

Ко всему количеству прозрачного раствора БЛПМ, полученному по 6.5.2.2, добавляют пипеткой 2 см^3 фосфатного буфера, перемешивают, и затем добавляют 0,5 см^3 раствора хлорида кальция.

После перемешивания добавляют небольшими порциями 4М раствора аммиака, тщательно перемешивая и периодически измеряя pH раствора бумажкой универсального индикатора.

При достижении pH = 8—9 добавление аммиака прекращают, а раствор оставляют на 30 мин для полноты образования осадка, содержащего кальциевую соль экзотоксина.

Затем осадок отделяют центрифугированием и промывают непосредственно в центрифужной пробирке 3 см^3 дистиллированной воды, после чего вновь центрифугируют. Центрифугат и промывную воду отбрасывают, а осадок используют для испытания.

Осадок смешивают с 1,00 г катион обменной смолы КУ-2-8 в H^+ — форме, добавляют пипеткой 5 см^3 дистиллированной воды, ресуспендируют осадок и периодически перемешивают суспензию в течение 30 мин. В результате реакции ионного обмена катионы кальция сорбируются смолой, а экзотоксин в форме кислоты переходит в раствор.

Суспензию центрифугируют, центрифугат фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу на 25 см^3. Центрифужную пробирку с осадком и фильтрат промывают дважды по 3—4 см^3 дистиллированной водой, объединяя промывные воды с фильтратом.

pH раствора доводят до 7—8 4М-раствором аммиака, затем доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

Полученный раствор, содержащий частично очищенный термостабильный экзотоксин, используют для испытаний.

6.5.3 Проведение испытаний

Из полученного раствора частично очищенного экзотоксина готовят 5-, 10- и 25-кратные разведения. Для этого берут мерные колбы на 25 см^3, маркируют их и наливают соответственно по 5,0, 2,5 и 1,0 см^3 исходного раствора.

Мерные колбы с аликвотами исходного раствора доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. При необходимости допускается приготовление аналогичным образом и других разведений.

Определение поглощения проводят на УФ-спектрофотометре в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при длинах волн 240, 260 и 290 нм. В кювету сравнения наливают дистиллированную воду.

Измерения начинают с наибольшего разведения и с длины волны 260 нм. Если значения поглощения находятся в пределах от 0,3 до 0,8 единиц оптической плотность, то показания фиксируют и делают измерения при 240 и 290 нм. Если поглощение ниже 0,3, то берут меньшее разведение и измеряют его поглощение при 260 нм и т.д. до получения оптической плотности в указанном интервале.

У выбранного разведения измеряют так же поглощение при 240 и 290 нм.

6.5.4 Обработка результатов

6.5.4.1 Прежде всего сравнивают поглощение при 240 и 260 нм. Если раствор поглощает при 240 нм больше чем при 260 нм, то препарат не выдерживает испытания по 6.5.

Если поглощение при 260 нм больше поглощения при 240 нм, то проводят вычисления по 6.5.4.2.

6.5.4.2 Массовую долю термостабильного экзотоксина C, %, вычисляют по формуле

$$C = 1{,}5 \cdot \frac{\left[A_{260} - \left(\frac{A_{290}}{A_{260}} - 0{,}023\right) \cdot A_{260}\right] \cdot P \cdot V \cdot 100}{D \cdot W}, \qquad (2)$$

где 1,5 — эмпирический коэффициент, учитывающий потери экзотоксина в процессе его предварительной очистки;

A_{260} — величина поглощения при 260 нм;

A_{290} — величина поглощения при 290 нм;

0,023 — постоянная величина, показывающая отношение значений поглощения при 290 нм и 260 нм для экзотоксина;

P — кратность разведения (во сколько раз был разведен исходный раствор);

V — объем раствора, в котором был растворен кальций-экзотокситный осадок, $см^3$;

100 — коэффициент пересчета в проценты;

D — поглощение раствора чистого экзотоксина при концентрации 1 $мг/см^3$ и длине кюветы 1 см, равное 16,7 о. е.;

W — навеска анализируемого препарата, мг.

Примечание — Вычисления проводят с точностью до 0,08 %.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. При большом расхождении проводят третье определение и из сходящихся результатов находят среднее арифметическое.

6.6 Определение массовой доли термостабильного экзотоксина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

В основе метода лежит использование высокоэффективной жидкостной ионообменной хроматографии с применением изократической элюции. Чувствительность метода — 2 мкг экзотоксина во введенной в колонку прибора пробе объемом до 50 $мм^3$. Время одного анализа — 20 мин.

6.6.1 Аппаратура, посуда, материалы и реактивы:

- жидкостной хроматограф высокого давления марки МилиХром (производитель Россия), обеспечивающий среднее квадратичное отклонение выходных сигналов — высот пиков, приведенное к нормирующему значению высоты 25 см, не более 3 %, с УФ-детектором и самописцем или других марок с аналогичными характеристиками;
- анионообменная смола по ГОСТ 20301, типа К-164-4, размер зерен 50—100 мкм;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или бидистиллированная;
- цилиндры мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 50 $см^3$;
- колбы мерные по ГОСТ 1770 1-го или 2-го класса точности, вместимостью 500 $см^3$ и 1000 $см^3$;
- воронки с фильтрующим дном по ГОСТ 25336 с размерами пор не свыше 40 мкм;
- насос водоструйный по ГОСТ 25336;
- пипетки химические с делениями по ГОСТ 29227 1-го или 2-го класса точности вместимостью 1 $см^3$ и 5 $см^3$;
- стаканы химические по ГОСТ 25336 вместимостью 50 $см^3$ или 100 $см^3$;
- натр едкий очищенный по ГОСТ 11078;
- стандартный образец термостабильного экзотоксина, содержащий 2 мг действующего вещества;
- калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198;
- кислота соляная ос.ч по ГОСТ 14261;
- кислота ортофосфорная ос. ч по ГОСТ 6552;
- универсальная индикаторная бумага по [3];
- центрифуга лабораторная со стаканами вместимостью не менее 10 $см^3$ и частотой вращения ротора не менее 6 тыс. об/мин;
- pH-метр-милливольтметр pH-121 по ГОСТ 8.012 или манометр универсальный ЭВ-74 или pH-метр других марок с погрешностью измерений ± 0,02 ед. pH.

6.6.2 Подготовка к проведению испытаний

6.6.2.1 Приготовление раствора соляной кислоты концентрации 0,5 $моль/дм^3$ (0,5М)

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают деионизированную воду в количестве 1/3 — 1/2 объема колбы, добавляют 42,5 $см^3$ концентрированной соляной кислоты, перемешивают, доводят до метки и вновь перемешивают. Перед употреблением раствор дегазируют.

6.6.2.2 Приготовление раствора едкого натра концентрации 0,5 $моль/дм^3$ (0,5М)

20 г едкого натра, взвешенного с точностью до первого десятичного знака, помещают в мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$, добавляют деионизированной воды до 1/4—1/3 объема колбы, перемешивают

до полного растворения щелочи, доводят объем до метки и вновь перемешивают. Перед употреблением раствор дегазируют.

6.6.2.3 Приготовление раствора калия фосфорнокислого однозамещенного концентрации 0,4 моль/дм^3 (0,4М)

27,8 г калия фосфорнокислого однозамещенного, взвешенного с точностью до второго десятичного знака, переносят в мерную колбу объемом 500 см^3, добавляют деионизированной воды до 1/4—1/3 объема колбы, перемешивают до полного растворения соли. Затем добавляют по каплям ортофосфорную кислоту до достижения раствором pH = 4,30 (контроль pH — по показаниям pH-метра), доводят объем почти до метки и вновь перемешивают.

Вновь контролируют на pH-метре величину pH раствора, которая должна находиться в пределах (4,30 ± 0,05) ед. pH и доводят pH до требуемого значения, добавляя по каплям фосфорную кислоту.

Окончательно доводят до метки деионизированной водой и перемешивают. Перед употреблением раствор дегазируют.

6.6.2.4 Приготовление раствора стандартного образца экзотоксина

Вскрывают флакончик стандартного образца экзотоксина и добавляют пипеткой 1 см^3 деионизированной воды. Перемешивают до полного растворения. Полученный раствор, содержащий 2 мг/мм^3 экзотоксина, допускается хранить при температуре 1 °С — 5 °С не более 5 сут.

6.6.2.5 Подготовка хроматографической колонки

0,5 г смолы К-164-4, взвешенной с точностью до второго десятичного знака, помещают в химический стакан вместимостью 100 см^3, добавляют 5 см^3 0,5М раствора едкого натра и выдерживают в течение 30 мин при периодическом помешивании.

Суспензию помещают на воронку с фильтрующим дном и под слабым вакуумом, создаваемым водоструйным насосом, промывают деионизированной водой до pH = 6,5, проверяя значение pH по бумажке универсального индикатора.

Суспензию на фильтре при отключенном вакууме заливают 5 см^3 0,5М раствора соляной кислоты, выдерживают 30 мин и промывают деионизированной водой до pH = 5,5, как описано выше.

Затем смолу заливают 5 см^3 0,4М раствора калия фосфорнокислого однозамещенного, имеющего pH = 4,30.

Для упаковки хроматографическую колонку прибора (62×2,0 мм) подсоединяют к насосу для жидкостной хроматографии, развивающему давление до 10 МПа (100 атм.), через емкость вместимостью 3—4 см^3, предназначенную для сорбента. Емкость заполняют суспензией сорбента.

Систему герметизируют и начинают прокачивать через нее дегазированный 0,4М раствор калия фосфорнокислого однозамещенного со скоростью 1 см^3/мин. Через 15 мин систему выключают. Колонку закрепляют на жидкостном хроматографе МилиХром и промывают элюентом — 0,4М раствором калия фосфорнокислого однозамещенного при скорости потока 0,1 см^3/мин до установленной базовой линии.

6.6.2.6 Регенерация хроматографической колонки

После каждого анализа колонку промывают элюентом при скорости потока 0,1 см^3/мин в течение 3—5 мин. Срок годности колонки составляет от 100 до 150 анализов. Отработанные партии сорбента извлекают из хроматографической колонки и затем регенерируют, как описано в 6.6.2.5.

6.6.2.7 Калибровка хроматографической колонки

Калибровку проводят по раствору стандарта β-экзотоксина, приготовленного по 6.6.2.4 в следующем режиме: температура (20 ± 3) °С, скорость элюции 0,1 см^3/мин, детектировано на УФ-оптической плотности на всю шкалу самописца.

Самописец прибора подключен на 100 мВ, скорость подачи ленты самописца 130 мм/мин.

В указанном режиме проводят пять — семь анализов раствора стандарта термостабильного экзотоксина, нанося на колонку 2, 3, 4 и т.д. мм^3 его. Калибровку проводят после каждой новой упаковки хроматографической колонки.

6.6.2.8 Подготовка исследуемого образца БЛПМ к исследованию

К навеске 0,93—1,05 г препарата, взвешенной с точностью до четвертого десятичного знака, непосредственно в бюксу наливают с помощью пипетки 5 см^3 деионизированной воды. Перемешивают стеклянной палочкой в течение 30 мин, после чего центрифугируют в течение 15 мин при 6 — 8 тыс. об/мин с целью получения прозрачного центрифугата. Осадок отбрасывают.

6.6.3 Проведение испытания

5,0 мм^3 раствора исследуемого образца препарата БЛПМ наносят на колонку хроматографа. Анализ проводят в условиях, описанных в 6.6.2.7. В случае регистрации очень большого (выходит за преде-

лы шкалы) или очень маленького (трудно обсчитать) пика экзотоксина соответственно уменьшают или увеличивают наносимый на колонку объем анализируемого раствора БЛПМ и повторяют испытания. Максимально допустимый объем раствора, наносимый на колонку, не должен превышать 50 мм^3.

Время выхода пика, соответствующего экзотоксину, составляет 8 мин.

6.6.4 Обработка результатов

6.6.4.1 Расчет площадей «пиков стандарта экзотоксина»

При содержании во введенном объеме пробы от 2 до 100 мкг стандарта экзотоксина имеет место линейная зависимость площади пика от количества вещества, нанесенного на колонку.

Площадь пиков стандарта экзотоксина S_0, мм^2, вычисляют по формуле

$$S_0 = H_0 \cdot \frac{W_0}{2}, \quad (3)$$

где H_0 — высота пика, мм;

W_0 — ширина пика на половине высоты, мм;

2 — коэффициент для расчета площади треугольника.

6.6.4.2 Расчет калибровочного коэффициента

Величину калибровочного коэффициента K, мкг/мм^2, вычисляют по формуле

$$K = \frac{c}{S_0}, \quad (4)$$

где c — количество экзотоксина (стандарта), содержащегося в растворе, нанесенное на колонку, мкг;

S_0 — площадь пика стандарта экзотоксина, мм^2, соответствующая нанесенному на колонку количеству стандарта.

За окончательную величину калибровочного коэффициента (K) принимают среднее арифметическое из пяти — семи вычислений, выполненных для различных количеств экзотоксина (c).

6.6.4.3 Расчет содержания термостабильного экзотоксина в препарате БЛПМ

Массовую долю термостабильного экзотоксина Э, %, вычисляют по формуле

$$Э = \frac{K \cdot S \cdot 100}{A \cdot V}, \quad (5)$$

где K — калибровочный коэффициент, мкг/мм^2;

S — площадь экзотоксина, содержащегося в препарате БЛПМ, мм^2;

100 — коэффициент пересчета;

A — коэффициент анализируемого раствора БЛПМ, мг/см^3;

V — объем раствора БЛПМ, нанесенного на колонку, мм^3.

Площадь пика экзотоксина S, мм^2, применяемую в формуле (5), вычисляют по формуле

$$S = H \cdot \frac{W}{2}, \quad (6)$$

где H — высота пика, мм;

W — ширина пика на половине высоты пика, мм;

2 — коэффициент для расчета площади треугольника.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 10 % относительных. При большем расхождении проводят третье определение и из сходящихся результатов выводят среднее арифметическое.

6.7 Определение безвредности при пероральном введении белым мышам

6.7.1 Аппаратура, посуда, материалы, реактивы и животные:

- шприц медицинский инъекционный по ГОСТ 22967 вместимостью 1 см^3 или 2 см^3 с иглой для перорального введения;
- весы лабораторные общего назначения марки АДВ-200 по ГОСТ Р 53228, 2-го или 3-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г или других аналогичных марок;
- колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3, 1-го или 2-го класса точности;

- палочки стеклянные;
- воронки лабораторные по ГОСТ 25336 диаметром 56 мм,
- стаканчики для взвешивания (бюксы) по ГОСТ 25336;
- колбы конические по ГОСТ 25336 вместимостью 100 $см^3$;
- цилиндры мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100 $см^3$;
- вода, дистиллированная по ГОСТ 6709;
- мыши белые массой 18—22 г;
- клетки для содержания белых мышей.

6.7.2 Проведение испытания

Взвешивают 4 г препарата БЛПМ с точностью до второго десятичного знака и растворяют в 60 $см^3$ дистиллированной воды. Перемешивают 10 мин стеклянной палочкой в конической колбе вместимостью 100 $см^3$, растирая комки. Затем количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят водой до метки и тщательно перемешивают. Перед отбором пробы еще раз перемешивают.

Раствор БЛПМ вводят белым мышам однократно с помощью шприца по 0,5 $см^3$ перорально. 0,5 $см^3$ раствора содержит 20 мг БЛПМ. Для проведения опыта берут шесть мышей, для контроля используют шесть мышей.

Контрольным мышам вводят по 0,5 $см^3$ дистиллированной воды.

6.7.3 Обработка результатов

Препарат считается безвредным, если все мыши в опытной группе остаются живыми и клинически здоровыми через 7 сут после введения им БЛПМ.

Если гибель части инфицированных в опытной или контрольной группах вызвана не специфическим действием препарата, а дефектом его введения, то заключение о безвредности может быть сделано не менее чем по пяти опытным животным, оставшимся в живых.

Введение считается дефектным, если гибель животного наступила в течение первых двух часов с клиникой, характерной для попадания жидкости в легкие.

Для гибели части мышей и в опыте, и в контроле (в срок от 2 ч до 7 сут) испытания считают недействительными и повторяют на том же количестве животных.

При гибели от специфического действия препарата хотя бы одной мыши в опытной группе и благополучном контроле, проверку безвредности повторяют на удвоенном количестве мышей.

При гибели от токсикоза в срок от двух часов до семи суток хотя бы одной подопытной мыши из двенадцати, и если все контрольные животные живы, препарат бракуют.

В случае дефекта введения заключение о безвредности может быть сделано не менее чем по десяти животным в опытной группе, оставшимся в живых.

Каждую мышь используют в опыте один раз, в контроле — не более трех раз.

7 Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение

7.1 Упаковка и маркировка

Упаковку и маркировку препарата БЛПМ производят по ГОСТ Р 57234 и ГОСТ Р 57249. Содержание предупредительной маркировки отражено в приложении А.

7.2 Транспортирование и хранение

Транспортирование и хранение БЛПМ проводят по ГОСТ Р 57234 и в соответствии с [5].

7.2.1 Хранение препарата проводят при температуре не ниже минус 40 °С и не выше 40 °С и относительной влажности воздуха не более 80 %.

8 Указания по применению

Препарат БЛПМ для ветеринарных целей применяют согласно заключению Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов о соответствии нормативно-технической документации на эти средства действующим ветеринарным правилам в установленном порядке.

9 Гарантии изготовителя

9.1 Изготовитель гарантирует соответствие БЛПМ требованиям настоящего стандарта при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения препарата.

9.2 Гарантийный срок хранения БЛПМ — один год со дня изготовления препарата. По истечении гарантийного срока годности перед использованием БЛПМ должен быть проверен на соответствие требованиям настоящего стандарта, и в случае соответствия всех показателей качества срок гарантии продлевался еще на шесть месяцев.

Библиография

[1] Приказ Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации от 4 декабря 2014 г. № 536	Об утверждении Критериев отнесения отходов к I-V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду
[2] Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 12 апреля 2011 г. № 302н	Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования)
[3] ТУ 6-09-1181—89	Бумага индикаторная универсальная для определения pH 1—10 и 7—14. Технические условия
[4] ТУ 6-09-4711—81	Реактивы. Кальций хлористый (обезвоженный), чистый
[5] СанПиН 1.2.2584—10	Гигиенические требования к безопасности процессов испытаний, хранения, перевозки, реализации, применения, обезвреживания и утилизации пестицидов и агрохимикатов, утвержденные Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 2 марта 2010 г. № 17 с изменениями и дополнениями от 28 марта, 10 июня 2016 г.

УДК 579.663:006.354 ОКС 07.100.01; 65.100.01

Ключевые слова: БЛПМ, смачивающийся порошок, кишечный инсектицид

БЗ 6—2017/76

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *А.А. Ворониной*

Сдано в набор 13.09.2017. Подписано в печать 04.10.2017. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68. Тираж 20 экз. Зак. 1681
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru