Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод обнаружения фенилбутазона в пищевых продуктах животного происхождения

Методические указания
МУК 4.1.3142—13

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.23
М54

М54 Метод обнаружения фенилбутазона в пищевых продуктах животного происхождения: Методические указания. —М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.—12 с.

1. Разработаны ФГБУ «НИИ питания» РАМН (О. И. Передеряев, М. Н. Богачук, А. Д. Малинкин, И. Б. Перова, М. А. Макаренко, В. В. Бессонов, К. И. Эллер,).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому надзору Федеральной службы по надзору в сфере защите прав потребителей и благополучия человека (протокол от 29 октября 2013 г. № 3).

3. Утверждены врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защите прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации А. Ю. Поповой 26 ноября 2013 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

© Роспотребнадзор, 2014
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014

Содержание

1. Метод измерений 5
2. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 5
3. Требования техники безопасности 7
4. Требования к квалификации персонала 7
5. Условия измерений 8
6. Отбор проб 8
7. Подготовка к определению 8
8. Извлечение фенилбутазона 9
9. Обнаружение фенилбутазона 10
10. Обработка результатов измерения 12
11. Оформление результатов измерений 12

УТВЕРЖДАЮ
Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главного государственного санитарного
врача Российской Федерации
А. Ю. Попова
26 ноября 2013 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Метод обнаружения фенилбутазона в пищевых продуктах животного происхождения

Методические указания
МУК 4.1.3142—13

Настоящие методические указания устанавливают порядок качественного определения фенилбутазона в мясе и субпродуктах убойных животных и птицы, а также продуктах их переработки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии тандемной масс-спектрометрией (предел обнаружения 0,05 мг/кг).

Методические указания носят рекомендательный характер.

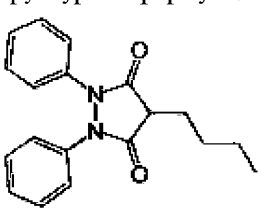
Название действующего вещества по ИСО: фенилбутазон.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 4-бутил-1,2--дифенил-3,5-пиразолидин-3,5-дион.

CAS №: 50-33-9.

Молекулярная масса: 308,37.

Структурная формула:



Фенилбутазон является производным пиразолона и относится к нестероидным противовоспалительным средствам. Применяется в медицинской практике как противовоспалительное, анальгезирующее и жаропонижающее средство. Доступен в России как лекарственное средство под торговым наименованием бутадион.

Фенилбутазон также применяется в ветеринарии как нестероидное противовоспалительное и обезболивающее лекарственное средство. В пищевых продуктах фенилбутазон не должен обнаруживаться в пределах обнаружения метода (0,05 мг/кг). Обнаружение фенилбутазона в пищевых продуктах связано с несоблюдением регламента его использования.

Физические свойства: белый кристаллический порошок, без запаха, температура плавления 105 °С, растворимость в воде (~0,7 мг/см^3), в этаноле (~ 50 мг/ см^3), свободно растворим в диэтиловом эфире и ацетоне. Максимум поглощения в подкисленном этаноле 239,5 нм (коэффициент экстинции 15488).

1. Метод измерений

Метод основан на определении фенилбутазона методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с тандемной масс-спектрометрией.

2. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

2.1. Средства измерений

Система жидкостной хроматографии, оснащенная насосом с возможностью градиентного элюирования и масс-спектрометрическим детектором (тройной квадруполь)	
Хроматографическая колонка для обращенно-фазовой хроматографии с силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом (линейные размеры 250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм)	
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 100 г и погрешностью ±0,0001 г	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 3 000 г и погрешностью ±0,1 г	ГОСТ 24104
Колбы мерные наливные объемом 50, 100, 200 и 500 см^3	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные лабораторные с носиком 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100 и 500 см^3	ГОСТ 1770
Пипетка 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5	ГОСТ 29227

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

2.2. Реактивы

Фенилбутазон (содержание основного вещества не менее 95 %)	
Ацетонитрил, осч	ТУ 6-09-14-2167—84
Диэтиловый эфир, хч	ТУ 2600-001--43852015—05
Петролейный эфир, ч	ТУ 6-09-124483
Этанол	ГОСТ Р 51723—01
Раствор аммиака 25 %-й, осч	ГОСТ 24147—80
Кислота соляная, осч	ГОСТ 14261—77
Кислота муравьиная, ч	ГОСТ 5848—73
Тетрагидрофуран (содержание основного вещества 99,9 %), импортный	
Гексан, хч	СТП ТУ COMP 2-008—06
Азот, осч, 1-й сорт (объемная доля азота 99,999 %),	ГОСТ 9293—74
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией, не требующих дополнительной очистки растворителей.

2.3. Вспомогательные устройства, материалы

Центрифуга для пробирок объемом не менее 50 см^3 и относительной силой центрифугирования не менее 4 000

Центрифуга для пробирок объемом не менее 1,5 см^3 и относительной силой центрифугирования не менее 10 000

Шейкер для встряхивания пробирок объемом не менее 50 см^3

Лабораторная мельница для измельчения проб мяса и субпродуктов убойных животных и птицы, а также продуктов их переработки массой не менее 150 г

Секундомер, обеспечивающий измерение времени с точностью не менее 10 с

Ротационный испаритель

Стаканы вместимостью 50 и 500 см^3 ГОСТ 25336

Колбы для выпаривания остроконечные объемом 50 см^3

Автоматические пипетки с переменным объемом 0,1—1,0 см^3

Полимерные пробирки объемом 50 см^3 с герметичной крышкой

Полимерные пробирки объемом 1,5 см^3 с герметичной крышкой

Примечание. Допускается использование вспомогательных средств измерений, устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

3. Требования техники безопасности

3.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76, требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф и масс-спектрометрический детектор.

3.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и 2.2.5.2308—07. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

4. Требования к квалификации персонала

К выполнению измерений допускают специалиста, прошедшего обучение, освоившего методику, владеющего техникой, имеющего опыт работы на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором.

5. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

• процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;

• выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

6. Отбор проб

Для учета специфики отбора проб отдельных видов продуктов, следует руководствоваться действующей нормативно-технической документацией по отбору проб для определения токсичных элементов для каждого конкретного вида продукции.

7. Подготовка к определению

7.1. Приготовление основного раствора стандарта фенилбутазона с концентрацией 50 мкг/см³

Навеску фенилбутазона, массой 0,010 г, взвешенную с погрешностью не более 0,0001 г, помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³, добавляют 120 см³ этанола, перемешивают до полного растворения, доводят объем до метки этанолом и тщательно перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре 18 °С в течение 12 месяцев.

7.2. Приготовление рабочего раствора стандарта фенилбутазона с концентрацией 1 мкг/см³

Мерной пипеткой переносят 2 см³ основного раствора стандарта фенилбутазона в мерную колбу на 100 см³, доводят объем до метки этанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре 18 °С в течение 3 месяцев.

7.3. Приготовление компонента А подвижной фазы

В стакан объемом 500 см³ добавляют 400 см³ дистиллированной воды и, тщательно перемешивая, прибавляют 0,5 см³ муравьиной кислоты. Содержимое переносят в мерную колбу на 500 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают.

7.4. Приготовление 7,5 %-го раствора аммиака

В стакан объемом 50 см³ мерным цилиндром вместимостью 50 см³ вносят 15 см³ 25 %-го раствора аммиака и 35 см³ дистиллированной воды.

7.5. Приготовление 6Н соляной кислоты

В стакан объемом 50 ^{3} мерным цилиндром вместимостью 50 см^3 отмеривают 30 см^3 кислоты соляной и 20 см^3 дистиллированной воды.

7.6. Приготовление смеси тетрагидрофуран/гексан (60/240)

В цилиндр объемом 500 см^3 отмеривают 240 см^3 гексана и доводят объем до 300 см^3 тетрагидрофураном.

7.7. Приготовление смеси ацетонитрил—водный раствор муравьиной кислоты (1 : 1)

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 мерным цилиндром вместимостью 25 см^3 отмеривают 25 см^3 ацетонитрила, пипеткой вместимостью 1 см^3 отмеривают 0,2 см^3 муравьиной кислоты, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

8. Извлечение фенилбутазона

Исследование каждого образца проводится в двух параллельных измерениях.

А. Измельчение и гомогенизация пробы

• Подвергают измельчению в лабораторной мельнице 150 г образца пищевого продукта.

Б. Извлечение фенилбутазона и очистка

• В пробирку объемом 50 см^3 отвешивают 5,0 г (навеска с точностью 0,1 г) гомогенизированной пробы.

• Добавляют 5 см^3 дистиллированной воды и 0,5 см^3 7,5 %-го раствора аммиака и встряхивают в течение 20 с.

• В пробирку добавляют 10 см^3 диэтилового эфира, закрывают и встряхивают в течение 10 с.

• В пробирку добавляют 10 см^3 петролейного эфира, закрывают и встряхивают в течение 30 с.

• Пробирку центрифугируют с силой центрифугирования 3 000 в течение 5 мин при комнатной температуре.

• Органический слой отбрасывают, оставшееся содержимое пробирки встряхивают в течение 10 с.

• Добавляют 1 см^3 6Н соляной кислоты и перемешивают.

• Добавляют 20 мл смеси тетрагидрофуран/гексан (60/240) и встряхивают на шейкере 10 мин.

• Пробирку центрифугируют с силой центрифугирования 3 000 в течение 5 мин при комнатной температуре.

• Упаривают 10 см³ полученного экстракта под вакуумом досуха при температуре 50 °С.

• Сухой остаток перерастворяют в 500 мкл смеси ацетонитрил—водный раствор муравьиной кислоты (1 : 1).

• Получившийся раствор центрифугируют в течение 5 мин при 10 000, надосадочную жидкость отделяют и исследуют.

9. Обнаружение фенилбутазона

9.1. Условия проведения ВЭЖХ

Условия разделения методом ВЭЖХ приведены в табл. 1.

Таблица 1

Параметр	Значение	
Насос		
Состав подвижной фазы	Компонент А – 0,1 %-й водный раствор муравьиной кислоты, компонент В – ацетонитрил	
Условия градиентного элюирования	Время, мин	Содержание компонента В, %
	0	50
	10	95
	15	95
	15,5	50
	22	50
Скорость потока	0,5 см³/мин	
Инжектор		
Объем ввода	0,010 см³	
Термостат колонок		
Температура	25 °С	
Хроматографические характеристики методики		
Коэффициент емкости (k`)	Должен составлять не менее 2,5	

9.2. Условия детектирования на тандемном масс-спектрометрическом детекторе

Условия детектирования на тандемном масс-спектрометрическом детекторе приведены в табл. 2.

Таблица 2

Параметр	Значение
Источник ионизации	Электростатическое распыление
Режим работы	Регистрация дочерних положительных ионов после разрушения материнских ионов (регистрация «перехода»)
Материнские ионы	309,4 Да
Дочерние ионы	160,3 и 120,1 Да
Напряжение на фрагменторе	110 В
Энергия разрушения	25 В для 160,3/172,3 и 30 В для 120,1/132,1

9.3. Идентификация фенилбутазона

Идентификацию компонентов на хроматограмме осуществляют путем сравнения с абсолютным временем удерживания стандарта фенилбутазона. Абсолютное время удерживания стандарта

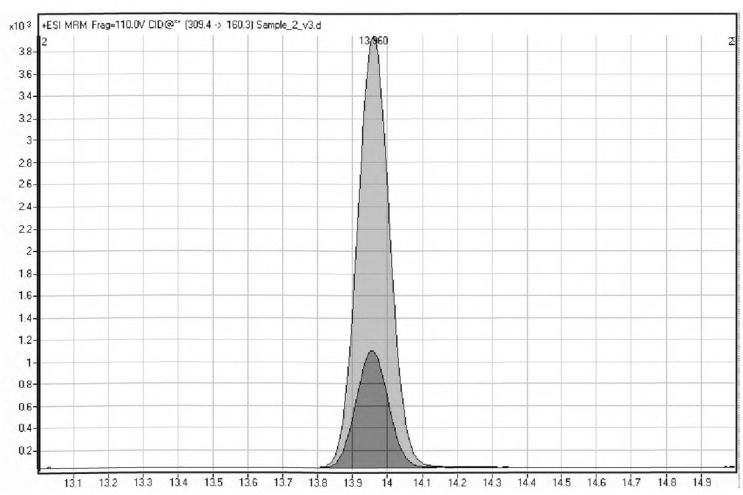


Рис. Хроматограмма исследуемого образца с добавлением фенилбутазона на уровне 0,100 мг/кг (верхняя линия – переход 309,4—160,3, нижняя – переход 309,4—120,1)

фенилбутазона устанавливают анализируя рабочий раствор стандарта фенилбутазона.

Пример получаемой хроматограммы приведен на рисунке.

10. Обработка результатов измерения

При обнаружении в предлагаемых условиях на обоих предлагаемых переходах пиков, соответствующих по времени удерживания стандартному образцу фенилбутазона, делается вывод о его наличии в исследуемом образце.

11. Оформление результатов измерений

Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде следующей записи: «*В исследуемом образце(ах) ... фенилбутазон не обнаружен (предел обнаружения метода 0,05 мг/кг)*» или «*В исследуемом образце(ах) ... обнаружен фенилбутазон (предел обнаружения метода 0,05 мг/кг)*».

Документ или запись удостоверяет лицо, проводившее измерения, а при необходимости – руководитель организации (предприятия), подпись которого заверяют печатью организации (предприятия).

gost.e-ecolog.ru