Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств дорамектина в пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.1.2480—09

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств дорамектина в пищевых продуктах: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—10 с.

1. Разработаны ГУ НИИ питания РАМН (академик РАМН В. А. Тутельян, К. И. Эллер, М. Г. Киселева, Л. Г. Левин, Е. П. Хромченкова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 25 декабря 2008 г. № 3).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 2 февраля 2009 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
2 февраля 2009 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств дорамектина в пищевых продуктах

Методические указания МУК 4.1.2480—09

Настоящие методические указания устанавливают методику определения дорамектина в мясе сельскохозяйственных животных и продуктах его переработки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, находящиеся в обращении на территории Российской Федерации, в т.ч. импортируемых в Российскую Федерацию.

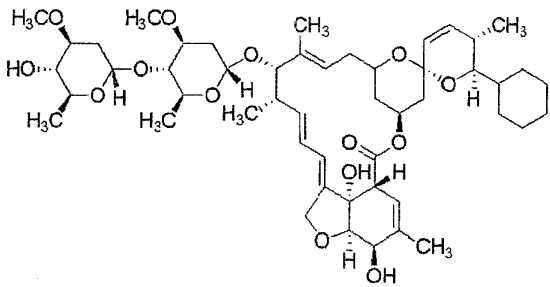
Методические указания могут быть использованы другими лабораторными центрами, осуществляющими контроль качества и безопасности пищевых продуктов и аккредитованными в установленном порядке.

1. Краткая характеристика препарата

Общепринятое название: дорамектин, ветранал.

Название по номенклатуре ИЮПАК: 25-циклогексил-5-О-диметил-25-ди(1-метил-пропил)авермектин. CAS: 117704-25-3.

Структурная формула:



$C_{50}H_{74}O_{14}$
Мол. масса: 899,11

Физические свойства: белый порошок, без запаха. Хорошо растворим в ацетонитриле.

Торговая марка: эндектоцид «Дектомакс» («Dectomax»).

Фирма-производитель: «Pfizer».

Форма выпуска: 1 %-й раствор доракмектина в растительном масле.

Область применения. «Дектомакс» используется в качестве противопаразитарного средства широкого спектра действия для лечения и профилактики заболеваний крупного рогатого скота, овец и свиней. Средство предназначено для парентерального введения крупному рогатому скоту.

2. Методика определения остаточных количеств доракмектина в мясе сельскохозяйственных животных и продуктах его переработки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. *Принцип метода.* Методика основана на определении остаточных количеств доракмектина в пищевых продуктах методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием ($\lambda_{возб.}$=360 нм, $\lambda_{эм.}$ – 470 нм) после экстракции доракмектина из образца. Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

2.1.2. *Метрологические характеристики метода.* При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой, погрешность (и её составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности P = 0,95 не превышает

значений, приведенных в табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 1

Метрологические параметры методики определения дорамектина в тканях сельскохозяйственных животных (p = 0,95, n = 10)

Анализируемый объект	Мышечная ткань, печень, почки, жир	
Диапазон загрязнения, мг/кг	0,003—0,1	0,1—2,5
Предел обнаружения, мг/кг	0,001	
Среднее значение степени извлечения, %	71,5	84,6
Стандартное отклонение повторяемости, S_r, мг/кг (в % от среднего значения)	0,017 (22,6)	0,078 (15,6)
Предел повторяемости, r, мг/кг (в % от среднего значения)	0,047 (62,6)	0,217 (43,4)
Предел относительной погрешности результата анализа, $\pm\delta$, %	25,5	13,4

2.2. Реактивы

Ацетонитрил, квалификации для ВЭЖХ
Тетрагидрофуран, квалификации осч
Метанол, квалификации для ВЭЖХ
н-Гексан, квалификации хч — ТУ 6-09-4521
Вода дистиллированная — ГОСТ 6709
Натрия гидроокись, квалификации осч — ГОСТ 4328
Аммиак водный (25—30 % NH_4OH) квалификации осч — ГОСТ 24147
Триэтиламин, ≥ 99,0 % (Sigma), CAS: 121-44-8
Трифторуксусный ангидрид, ≥ 99,0 % (Sigma)
Дорамектин (UK-67,994), 91,9 %, «Pfizer»

2.3. Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы

Хроматографическая система, состоящая из жидкостного хроматографа высокого давления, дегазатора, спектрофлюориметрического детектора и системы для сбора и обработки хроматографических данных.
Колонка для ВЭЖХ, заполненная октадецилсиликагелем 250 × 4,5 мм, 5 мкм (например, Phenomenex Luna C18 или аналогичная)

Микрошприц объемом 25 мкл для ВЭЖХ (Hamilton, США)	
Шприц для инъекций, пластиковый, объемом 25 $см^3$	
Виалы стеклянные с закручивающейся крышкой «для автосамплера» (в крышке окошко, герметично закрытое резиновой вкладкой), объемом 2—4 $см^3$	
Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С	ТУ 64-1-2451
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г и погрешностью ± 0,0001 г	ГОСТ 24104
Ротационный испаритель ИР-1М или аналогичный	ТУ 25-11-917
Блендер	
Баллон со сжатым азотом квалификации «ПНГ»	ГОСТ 9293
Воронка делительная на 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Колбы мерные наливные 2-50-2, 2-100-2, 1-1000-2	ГОСТ 1770
Колбы грушевидные с конусом 14/23 вместимостью 100 $см^3$	ГОСТ 25336
Цилиндры по ГОСТ 1770 вместимостью 100 $см^3$	
Пипетки 4(5)-1-2, 4(5)-2-10, 4(5)-2-25	ГОСТ 29227
Фильтры беззольные ФО-ФС-15 «красная лента» и «синяя лента»	ТУ 2642-001-42624157

Допускается использование приборов и посуды с метрологическими характеристиками и реактивов квалификацией не ниже указанных в МУК.

2.4. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ Р 51447—99 «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб». Для длительного хранения образцы продуктов замораживаются и хранятся при –18 °С до анализа.

Перед анализом образцы тщательно измельчают в гомогенизаторе или блендере.

2.5. Подготовка к проведению измерений

2.5.1. *Приготовление подвижной фазы и кондиционирование хроматографической колонки.* В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 530 $см^3$ ацетонитрила, 270 $см^3$ тетрагидрофурана, 200 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают и выдерживают до

комнатной температуры. Раствор дегазируют. Хроматографическую колонку кондиционируют до минимального дрейфа базовой линии.

2.5.2. *Приготовление стандартных растворов дорамектина.* 0,050 ± 0,001 г кристаллического дорамектина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в 50 см^3 ацетонитрила, доводят ацетонитрилом до метки и тщательно перемешивают. Получают основной стандартный раствор в ацетонитриле с массовой долей дорамектина 0,5 мг/см^3.

Для построения градуировочной кривой методом последовательного разбавления ацетонитрилом готовят рабочие стандартные растворы с содержанием дорамектина 0,100, 0,010, 0,001 и 0,0001 мг/см^3. Отбирают аликвоты стандартных растворов, упаривают их на ротационном испарителе при температуре не более 40—45 °С. Дорамектин переводят во флюоресцирующее производное, хроматографируют в трех повторностях (объем пробы 10 мм^3). Строят график зависимости средних площадей пиков от концентрации дорамектина в мг/ см^3.

Основной и рабочие стандартные растворы дорамектина хранят в стеклянной посуде (мерной колбе) с притертой пробкой в прохладном месте (при температуре около 4 °С). Сроки годности основного раствора 12 месяцев, рабочих – 2 месяца.

2.5.3. *Подготовка образца.* Измельченный образец, массой 2,5 г помещают в 20 см^3 ацетонитрила, закрывают емкость пробкой или парафильмом, помещают в теплую (40—50 °С) ультразвуковую баню на 20—25 мин. Затем охлаждают, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин. Супернатант декантируют в делительную воронку и обезжиривают двумя порциями гексана по 10 см^3. Ацетонитрильный экстракт дорамектина собирают в круглодонную колбу и упаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 40—45 °С.

2.5.4. *Получение флуоресцирующего производного дорамектина*

А) Приготовление раствора аммиака в метаноле.

В виалу (крышка герметичная с резиновой вкладкой, которую можно проколоть иглой) наливают 2—3 см^3 метанола, крышку завинчивают. На пластиковый шприц для инъекций надевают иглу, вынимают поршень. Внутрь шприца помещают 4—6 гранул сухого гидроксида натрия, наливают водный аммиак и вставляют поршень. Шприц переворачивают вверх иглой, выделяющийся газ вытесняет из иглы воду, на иглу надевают виалу так, чтобы аммиак барботировал через метанол. Поршень шприца придерживают, насыщение происходит в течение 0,5—

1 мин. Перед каждым анализом рекомендуется готовить свежий раствор аммиака в метаноле.

Б) Получение флуоресцирующего производного дораметина.

К остатку после упаривания аликвоты стандартного образца или пробы добавляют 0,15 см^3 ацетонитрила, 0,1 см^3 триэтиламина и 0,05 см^3 трифторуксусного ангидрида, смесь перемешивают и отдувают в токе азота на водяной бане. К оставшемуся в колбе маслянистому содержимому добавляют 0,25 см^3 свежеприготовленного 2М раствора аммиака в метаноле, снова отдувают в токе азота на водяной бане, добавляют к содержимому 0,4 см^3 ацетонитрила (объем пробы $V_{пр}$ = 0,5 см^3). Аликвоту раствора образца V_x (от 0,005 до 0,02 см^3) вводят в хроматограф.

2.6. Выполнение измерений

Условия хроматографического анализа.

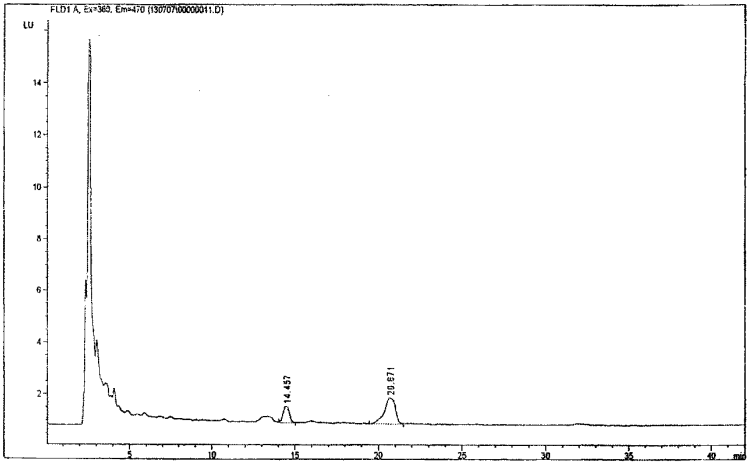
Хроматографическая колонка: колонка для ВЭЖХ, заполненная октадецилсиликагелем (например, Phenomenex Luna C18, 250 × 4,5 мм, 5 мкм).

Подвижная фаза: ацетонитрил – 53 %, тетрагидрофуран – 27 %, вода – 20 % об.

Скорость подачи элюента: 1,0 см^3/мин.

Детектирование: флюориметрическое, $\lambda_{возб.}$ = 360 нм, $\lambda_{эм.}$ – 470 нм.

Объем вводимой пробы 5—20 мм Линейность детектирования сохраняется в пределах 0,1—125 нг дораметина.



Абсолютное время удерживания дорамектина в приведенных условиях – 14,5 ± 0,1 мин.

Хроматограмма образца сала, добавка дорамектина составляет 10 мкг/кг.

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза, вычисляют среднюю площадь пика, соответствующего дорамектину.

2.7. Обработка результатов измерения

2.7.1. *Калибровка хроматографа и построение градуировочной кривой.* Отбирают аликвоты стандартных растворов, упаривают их на ротационном испарителе при температуре не более 40—45 °С. Дорамектин переводят во флюоресцирующее производное, хроматографируют в трех повторностях (объем пробы 10 мм^3) (п. 2.6). Строят график зависимости средних площадей пиков от концентрации дорамектина в мг/см^3.

Градуировку во всем диапазоне измеряемых концентраций проводят при смене колонки и/или предколонки; при замене стандартного образца и/или реактивов; после проведения ремонта; после длительного простоя хроматографа (2 недели и более);

2.7.2. *Оформление результатов.* Содержание дорамектина можно рассчитать по градуировочному графику или методом внешнего стандарта. В последнем случае для расчетов используют стандартный раствор, площадь пика которого наиболее близка к площади пика дорамектина в образце. Для расчета по методу внешнего стандарта используют формулу:

$$X = 400\frac{V_{ОБР} \times V_{СТ} \times C_{СТ} \times S_X}{V_X \times S_{СТ}}, \text{ где}$$

X – содержание дорамектина в пробе, мг/кг;

$C_{СТ}$ – содержание дорамектина в стандартном растворе, мг/ см^3;

S_X – площадь пика дорамектина в анализируемом образце;

$S_{СТ}$ – площадь пика стандарта;

$V_{СТ}$ – объем аликвоты стандартного раствора дорамектина, см^3;

$V_{ОБР}$ – объем образца (0,5 см^3);

V_X – объем образца, введенный в хроматограф (0,005—0,02 см^3).

3. Оперативный контроль результатов измерений

3.1. Контроль повторяемости результатов определения

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости:

$$\frac{2\times|X_1 - X_2|\times 100}{(X_1 + X_2)} \le \delta$$

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;

δ – предел относительной погрешности (табл. 1), в %.

При невыполнении условия выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

4.Требования техники безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на газовый хроматограф.

5.Требования к квалификации операторов

Работу по указанной методике могут исполнять высококвалифицированные специалисты в области газожидкостной хроматографии и санитарной химии. Исполнители должны быть проинструктированы об основных мерах техники безопасности при работе с веществами 1—2 класса опасности, органическими растворителями, а также с правилами безопасности при работе в химической лаборатории (п. 3).

6. Условия измерений

Помещение лаборатории должно соответствовать санитарным правилам проектирования, оборудования, эксплуатации и содержания производственных и лабораторных помещений, предназначенных для проведения работ с веществами 1—2 класса опасности, органическими растворителями. Аналитическая лаборатория должна быть оснащена вентиляционной системой согласно ГОСТ 12.4.021.

Определение остаточных количеств дорамектина в пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.1.2480—09

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 31.07.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 200 экз.

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru