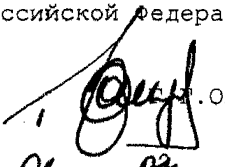
УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Российской Федерации-
Первый заместитель
Министра здравоохранения
Российской Федерации



Г.Онищенко

«04» 03 2004 г.

Дата введения: с 1 мая 2004 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение массовой концентрации клозантела в органах и тканях животных, плазме и молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1875 – 04

1. Область применения

Методические указания по определению массовой концентрации клозантела в продуктах питания животного происхождения предназначены для проведения лабораторных исследований безопасности пищевой продукции органами и учреждениями государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, а также могут быть использованы организациями, осуществляющими контроль качества пищевых продуктов в соответствии с санитарными правилами и нормами «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. СанПиН

gost.e-ecolog.ru

2.3.2.560-96», аккредитованными в установленном порядке.

2. Общие положения

Клозантел - противопаразитарный препарат обладает широким спектром активности против экто- и эндопаразитов. Действует на зрелые и личиночные стадии развития паразитов.

Проявляет ярко выраженную активность против трематод, желудочно-кишечного тракта нематод, личинок оводов, чесоточных клещей у крупного и мелкого рогатого скота. Клозантел обладает также высокой эффективностью при фасциолезе.

На основе клазантела и его натриевой соли производится ряд ветеринарных препаратов.

Настоящие методические указания устанавливают хроматографическую методику количественного анализа продуктов питания животного происхождения на содержание клозантела с нижним пределом измерения 0,1 мг/кг.

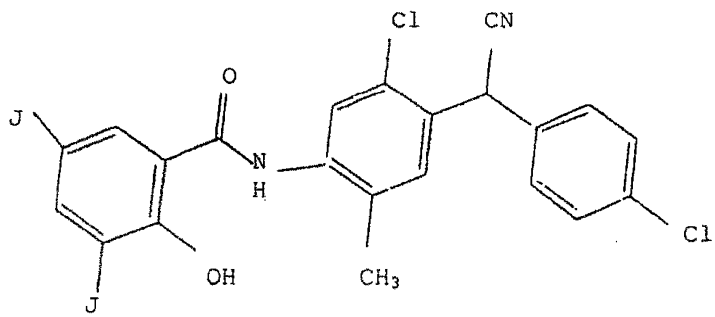
3. Физико-химические свойства, токсикологическая характеристика и гигиенические нормативы

$C_{22}H_{14}Cl_2J_2N_2O$ **Мол. масса: 663,08**

Клозантел, относящийся к классу производных салициланилидов, представляет собой порошок белого или желтоватого цвета, не растворяется в воде, слабо растворяется в низших спиртах,

хлороформе, растворяется в демитилсульфоксиде, диметилформалиде, диметилацетамиде, пропиленгликоле, полиэтиленгликоле. Натриевая соль клозантела - клозантела натрий дигидрат растворяется в низших спиртах.

Температура плавления ($T_{пл}$) - 217,8°С.



Клозантел относится к умеренно опасным веществам 3 класса опасности: $ЛД_{50}$ при пероральном введении белым крысам составляет 2300 мг/кг. В терапевтической (10 мг/кг) и повышенных дозах препарат не обладает эмбриотоксическими, тератогенными, мутагенными и аллергенным свойствами.

4. Погрешность измерения

Методика обеспечивает выполнение измерений с суммарной погрешностью не превышающей 22% при доверительной вероятности - 0,95.

5. Метод измерений

Измерения массовой концентрации клозантела основаны на использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением УФ-детектора на колонке с обращенной фазой после экстракции его органическими растворителями из органов и тканей животных, плазмы с последующей очисткой экстрактов. Детектирование ведут при длине волны 237 нм.

Чувствительность метода составляет 0,1 мкг в пробе, нанесенной на колонку.

6. Средства измерения, вспомогательные устройства, материалы, реактивы, растворы

6.1. Средства измерения

- аналитический хроматограф, Waters или аналогичный с УФ-детектором, инжектором с объемом дозирующей петли – 0,05 $см^3$, с компьютерной системой обработки хроматографических данных (или с интегратором);
- весы аналитические 2-го класса точности, ГОСТ 24104-88;
- весы микроаналитические, точность взвешивания до 4-го десятичного знака, Chan (США) или аналогичные;
- автоматические пипетки, ТУ 64-1-3329-81;
- колбы мерные, вместимостью 100 мл, ГОСТ 1770-74;
- цилиндры градуированные, вместимостью 100 мл, ГОСТ 1770-74;
- шприц Гамильтона (Швейцария).

6.2 Вспомогательные устройства

- центрифуга, центрифужные полиэтиленовые пробирки, вместимостью 50 и 15 мл;
- ультразвуковой диспергатор УЗДН-1М или аналогичный;
- миксер или гомогенизатор;
- холодильник;
- колонка аналитическая Диасорб-130-С16Т 250х4 мм, с размером частиц 6 мкм (фирма «БиоХимМак», Россия) или аналогичная;
- аппарат для упаривания – Vortex, Evaporater и др.;
- роторный испаритель с колбами;
- сушильный шкаф;
- патроны $С_1 1$ (фирма «БиоХимМак», Россия);
- сцинтиляционные флаконы («Сигма», каталог 2001-2002 гг. № .)

6.3. Реактивы

• ацетонитрил, хроматографически чистый ТУ ИРЕА 22-66 или импортный;

• гексан;

• спирт бутиловый третичный;

• спирт этиловый, ГОСТ 5964-84;

• спирт метиловый, ГОСТ 6995-67;

• хлороформ;

• стандартный образец - клозантела натрия дигидрат, поставляемый НВЦ «Фармбиомед», содержание действующего вещества указано на этикетке.

7. Требования безопасности

7.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005-88.

7.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают меры противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-76.

7.3. При выполнении измерений с использованием хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019-79 и инструкции по эксплуатации прибора.

8. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке результатов допускают лиц с высшим и средним специальным образованием, имеющих навыки работы на жидкостном хроматографе.

9. Условия измерений

9.1. Приготовление растворов и подготовку проб к анализу проводят в нормальных условиях при температуре воздуха (20±10) °С, атмосферном давлении 84-106 кПа и влажности воздуха не более 80%.

9.2. Измерения на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

9.2. Измерения на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

10. Подготовка к выполнению измерения

10.1. Приготовление растворов

10.1.1. Стандартный раствор дигидрата клозантела натрия

Готовят основной раствор клозантела натрия дигидрата в метиловом спирте таким образом, чтобы в 100 $см^3$ раствора содержалось 4 мг клозантела. Раствор хранению не подлежит.

Из основного раствора следующие разведения градуировочных растворов: в стеклянные пробирки объемом 5 $см^3$ вносят 1,0; 0,5; 0,1; 0,02 и 0,01 $см^3$ основного раствора и доводят объем до 1 $см^3$ метиловым спиртом.

10.1.2. Раствор элюента готовят путем смешивания метилового спирта с ортофосфорной кислотой 0,01М в соотношении 9:1.

10.2. Подготовка прибора

Общую подготовку прибора осуществляют согласно инструкции по эксплуатации.

10.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, включающую взаимосвязь величины хроматографического сигнала от массы анализируемого вещества в хроматографируемом объеме пробы, устанавливают по методу абсолютной калибровки с использованием серии подготовленных градуировочных растворов, содержащих 40; 20; 10; 4; 0,8 и 0,4 мкг клозантела/$см^3$. На аналитическую колонку наносят по 0,05 $см^3$ подготовленных растворов.

Условия детектирования:

Подвижная фаза - метиловый спирт: ортофосфорная кислота 0,01 М в соотношении 9:1.

Скорость потока - 1 $см^3$/мин; давление 120-160 бар.

Чувствительность детектора - 0,05.

Длина волны - 237 нм.

На хроматограмме отмечают пик со временем удерживания 7 мин.

По результатам анализа калибровочных образцов строят калибровочный график - на оси абсцисс откладывают количество клозантела, нанесенного колонку, на оси ординат - площадь пика.

10.4. Отбор проб

Отбор проб, для анализа ведут в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения количеств пестицидов», № 2051 от 21.09.79 (Москва).

В день забоя животных пробы органов и тканей берут по 200-500 г, помещают в целлофановые пакеты (для каждого органа - свой пакет). Пакеты снабжают этикетками, на которых указывают: дату забоя животного, название органа.

Пробы для анализа хранят в морозильнике при температуре от -18°С до -20°С (допускается хранение до 2-х месяцев).

Кровь отбирают в пробирки с гепарином и центрифугируют. Супернатант хранят в морозильнике при температуре -20°С.

10.5 Подготовка проб к определению

10.5.1 Экстракция и очистка экстрактов

Плазма

1 $см^3$ плазмы помещают в сцинтиляционный флакон, туда же добавляют 2 $см^3$ ацетонитрила и 4 $см^3$ хлороформа. Пробы встряхивают на вортексе 10 мин., затем центрифугируют при 1000 g в течение 15 мин. Органическую фазу переносят в сцинтиляционный флакон объемом 20 $см^3$ и упаривают досуха в вакуумном сушильном шкафу при температуре 50°С. Экстракцию плазмы проводят дважды. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила. Ацетонитрильный раствор трижды промывают 0,5 $см^3$ гексана. Гексановые экстракты отбрасывают, а ацетонитрильный раствор упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ метанола и обрабатывают ультразвуком в течение 1 минуты.

Раствор используют для хроматографии.

Мышцы, почки и печень

Полученные пробы ткани выдерживают в морозильной камере при Т = -18°С в течение 1 суток. Затем медленно оттаивают при Т = 4°С в течение 12 часов. Пробы вновь замораживают при Т = -18°С на 1-2 часа, оттаивают при комнатной температуре.

Навеску 5,0 г измельчают в гомогенизаторе (или острыми ножницами) и помещают в сцинтилляционный флакон, добавляют 6 $см^3$ ацетонитрила, пробы обрабатывают на ультразвуковой бане в течение 5 минут. Затем встряхивают на вортексе 10 минут и центрифугируют 1000*g в течение 15 минут. Экстракт переносят в сцинтиляционный флакон объемом 20 $см^3$, остаток повторно экстрагируют 4 $см^3$ ацетонитрила и упаривают досуха в вакуумном сушильном шкафу при температуре 45°С (при упаривании добавляют небольшое количество третичного бутилового спирта для избежания вскипания, для удаления остатков воды добавляют небольшое количество ацетонитрила). Сухой остаток растворяют в 4 $см^3$ ацетонитрила. Ацетонитрильный раствор трижды промывают 3 $см^3$ гексана. Гексановые экстракты отбрасывают, а ацетонитрильный раствор упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила. Обрабатывают ультразвуком в течение 1 минуты. Раствор используют для хроматографии.

Экстракты из печени перед хроматографированием подвергают очистке на патронах С1 следующим образом: патрон С1 уравновешивают 5 $см^3$ ацетонитрила. На патрон наносят образец экстракта из печени объемом 1$см^3$ и элюируется 5 $см^3$ ацетонитрила. Элюат упаривают досуха при температуре 45°С. Сухой остаток растворяют 1 $см^3$ ацетонитрила. Раствор используют для хроматографии.

11. Выполнение измерений

Анализ включает не более 10 испытуемых образцов. Перед началом и в конце работы проводят анализ стандартного образца, чтобы убедиться в стабильности работы системы.

Объем наносимой на колонку пробы для всех объектов составляет 0,05 $см^3$.

Условия проведения процесса хроматографирования описаны в разделе для стандартного образца.

12. Обработка результатов

Для обработки результатов хроматографирования используется программа «Мультихром». На хроматограммах исследуемых образцов определяют площадь пиков, по времени удерживания соответствующих пикам стандарта клозантела.

По калибровочному графику находят содержание клозантела в объеме инжектируемой пробы испытуемого образца.

Содержание клозантела в образце рассчитывают по формуле:

$$Скп. = \frac{Скп.и V_2}{V_1 V_3 K}, \text{ где}$$

Скп. - концентрация клозантела в образце, $мкг/см^3$;

Скп.и - содержание клозантела в объеме инжектируемой пробы образца, определяют по графику, мкг;

V_1 - объем пробы, нанесенной на колонку, $см^3$ (0,05 $см^3$)

V_2 - объем пробы, подготовленной для ВЭЖХ, $см^3$ (1 $см^3$);

V_3 - объем пробы плазмы, взятой для экстракции;

K - коэффициент, учитывающий степень извлечения клозантела (получен при постановке модельных опытов с внесением известных количеств клозантела, K = 0,8).

Разработчики:: к.м.н. В.Г. Тер-Симонян, к.х.н. С.В. Авчук,
к.б.н. Е.Б. Кругляк,.
(ООО НБЦ «Фармбиомед», Москва)

gost.e-ecolog.ru