УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,
Первый заместитель министра здравоохранения
Российской Федерации
Г.Г. Онищенко

МУК 4.1.1611-04
Дата введения:

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств Ивермектина в печени, почках, мышцах и жире сельскохозяйственных животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения в печени, почках, мышцах и жире сельскохозяйственных животных массовой концентрации ивермектина в диапазонах 0,001 - 0,02 мг/кг (печень, почки, мышцы); 0,002 – 0,04 мг/кг (жир).

Ивермектин - действующее вещество ветеринарного препарата БАЙМЕК 1% и.-р., фирма производитель Байер АГ (Германия).

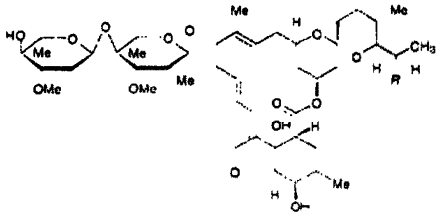
Ивермектин – смесь компонентов H_2B_{1a} и H_2B_{1b}. Содержание компонента H_2B_{1a} не менее 80%.

Компонент H_2B_{1a} - (*2aE,4E,8E*)-(5′*S*,6*S*,′*R*,7*S*,11*R*,13*R*,15*S*,17a*R*,20*R*,20a*R*,20b*S*)-20,20b-дигидрокси-5′,6,8,19-тетраметил-7-[[(3-*O*-метил-4-*O*-(3-О-метил-2,6-дидеокси-α-L-арабино-гексапиранозил)-2,6-дидеокси-α-L-арабино-гексапиранозил]-окси]-6′-[(1*S*)-1-метилпропил]-3′,4′,5′,6,6′,7,10,11,14,15,17a,20,20a-,20b-тетрадека-гидроспиро[11,15-метано-2H,13H,17H-фуро[4,3,2pq][2,6]бензодиокса-циклоокта-децен-13,2′-[2H]пиран]-17-он (или 5-О-деметил-22,23-дигидроавермектин A_{1a})

Компонент H_2B_{1b} - (*2aE,4E,8E*)-(5′*S*,6*S*,′*R*,7*S*,11*R*,13*R*,15*S*,17a*R*,20*R*,20a*R*,20b*S*)-20,20b-дигидрокси-5′,6,8,19-тетраметил-6′-(1-метилэтил)-7-[[(3-*O*-метил-4-*O*-(3-О-метил-2,6-дидеокси-α-L-арабино-гексапиранозил)-2,6-дидеокси-α-L-арабино-гексапиранозил]-окси]-3′,4′,5′,6,6′,7,10,11,14,15,17a,20,20a-,20b-тетрадека-гидроспиро[11,15-метано-2H,-13H,17H-фуро[4,3,2pq][2,6]бензодиокса-циклоокта-децен-13,2′-[2H]пиран]-17-он (или 25-(1-метилэтил)-5-*O*-деметил)-25-де(1-метилпропил)-22,23-дигидроавермектин A_{1a}).

gost.e-ecolog.ru

метилпропил)-22,23-дигидроавермектин A_{1a}).



Компонент	R	Эмпирическая формула	Молекуляная масса
H_2B_{1a}	CH_2-CH_3	$C_{48}H_{74}O_{14}$	875
H_2B_{1a}	CH_3	$C_{47}H_{72}O_{14}$	861

Ивермектин - кристаллический порошок, без запаха, цвет от белого до желтовато - белого. Насыпная плотность от 1,1 до 1,3 г/см^3. Практически нерастворим в воде (около 10 мкг/дм^3 при 21^{0}C), плохо растворим в алифатических углеводородах и циклогексане. Растворим в этиловом спирте, хорошо растворим в метиленхлориде, метилэтилкетоне, пропиленгликоле, полиэтиленгликоле. Ивермектин получают путем селективного каталитического восстановления абамектина, который в свою очередь является продуктом жизнедеятельности почвенных организмов Streptomyces avermitilis.

Температура плавления 150 – 155^{0}C.

Краткая токсикологическая характеристика:

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс: 42,8 – 52,8 мг/кг, для мышей: 11.6 – 87.2 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 660 мг/кг, для кроликов – 406 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LK_{50}) для крыс > 5110 мг/м^3.

Область применения препарата

Баймек 1% ИР используется в качестве антипаразитарного и антигельминтного средства (против нематод, вшей, кровососок, возбудителей саркоптоидозов, личинок овода и других членистоногих) для крупного рогатого скота, овец, свиней путем подкожного введения.

Гигиенические нормативы:

ДСД - 0,001 мг/кг массы тела

МДУ:

- для крупного рогатого скота: печень – 0,1 мг/кг, жир - 0,04 мг/кг; мясо – не требуется;
- для овец и свиней: печень – 0,015 мг/кг, жир - 0,02 мг/кг; мясо – не требуется.

1. Метрологические характеристики метода

Метрологические характеристики метода представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0,95, n = 24				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, %
Печень	0,001	0,001 – 0,02	83,48	6,21	6,5
Почки	0,001	0,001 – 0,02	82,89	5,15	5,4
Мышцы (мясо)	0,001	0,001 – 0,02	82,93	5,45	5,7
Жир	0,002	0,002 – 0,04	84,00	5,69	5,9

Таблица 2

Полнота извлечения ивермектина из проб печени, почек, мышц и жира сельскохозяйственных животных
(6 повторностей для каждой концентрации)

Среда	Внесено ивермектина мг/кг	Обнаружено ивермектина мг/кг	Полнота извлечения, %
1	2	3	4
Печень (свиная)	0,001	0,000804 ± 0,000078	80,44
	0,002	0,001691 ± 0,000205	84,54
	0,01	0,008292 ± 0,000692	82,92
	0,02	0,017209 ± 0,002747	86,04
Почки (свиные)	0,001	0,0008066 ± 0,000076	80,58
	0,002	0,001624 ± 0,000136	81,19
	0,01	0,008514 ± 0,000244	85,14
	0,02	0,016932 ± 0,002236	84,66

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Мышцы (мясо, свинина)	0,001	0,0007940 ± 0,000077	79,40
	0,002	0,001722 ± 0,000241	86,09
	0,01	0,008387 ± 0,000701	82,87
	0,02	0,016676 ± 0,001632	83,38
Жир свиной	0,002	0,001678 ± 0,000211	83,89
	0,004	0,003302 ± 0,000290	82,56
	0,02	0,017031 ± 0,002494	85,16
	0,04	0,033761 ± 0,003936	84,40

2. Метод измерений

Методика основана на определении вещества с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектором после экстракции из анализируемой пробы органов и тканей сельскохозяйственных животных этилацетатом, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами, превращения ивермектина во флуорогенное производное и последующей очистки на патроне для твердофазной экстракции Florisil Sep Pak.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостной хроматограф с флуориметрическим детектором с переменной длиной волны (фирмы Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15945-97
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности +/- 0,038 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 и 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0; 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные вместимостью 5 или 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 10, 25, 50, 100, 200, 500 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Ивермектин с содержанием компонента H_2B_{1a} - 83,9%; H_2B_{1b} – 5,9% (Байер АГ, Германия)	
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ-6-09-4326-76
Вода бидистиллированная, деионизованная или перегнанная над $KMnO_4$	ГОСТ 6709
н-Гексан, хч	ТУ-6-09-3375
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995
1-N-метилимидазол, puriss. for DNA synthesis, ≥99%, Fluka	
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233
Трифторуксусный ангидрид, purum; ≥98.0% (GC), Fluka	
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч	ГОСТ 22300

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аллонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами)	
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Воронки делительные вместимостью 150 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30-37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Гомогенизатор	
Груша резиновая	
Колбы плоскодонные вместимостью 200 – 250 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 50, 100 и	ГОСТ 9737

250 $см^3$	
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	
Насос водоструйный	ГОСТ 10696
Патроны для твердофазной экстракции Florisil Sep Pak (Waters, США)	
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	ТУ 25-11-917-74
Стаканы химические, вместимостью 100 и 400 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Zorbax ODS, зернением 5 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50 – 100 $мм^3$	
Шприц медицинский с разъемом Льюера	ГОСТ 22090

Допускается применение хроматографических колонок и другого оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами по ГОСТу 12.1005.

4.2. При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТом 12.1.019 и инструкцией по эксплуатации прибора.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

• процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха $(20\pm5)^0$С и относительной влажности не более 80%.

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

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка патронов для очистки экстрактов, проверка хроматографического поведения вещества на патронах для твердофазной экстракции.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.2. Очистка н-гексана

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, далее водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.1.3. Очистка этилацетата

Этилацетат промывают последовательно 5%-ным водным раствором карбоната натрия, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 50.

7.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 980 $см^3$ метанола, добавляют 20 $см^3$ бидистиллированной или деионизированной воды, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.2) при скорости подачи растворителя 2 $см^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

7.4. Приготовление реактива для дериватизации

Смешивают трифторуксусный ангидрид и свежеперегнанный ацетонитрил в объеме 1 : 2. Реактив годен к употреблению в течение рабочего дня.

7.5. Приготовление градуировочных растворов

7.5.1. Исходный раствор ивермектина для градуировки (концентрация 100 мкг/$см^3$) В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 0,0100 г ивермектина, растворяют в 50-70 $см^3$ ацетонитрила, доводят ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранится в морозильной камере в течение месяца.

Растворы № 1-5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.5.2. Раствор № 1 ивермектина для градуировки (концентрация 1 мкг/$см^3$)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 1 $см^3$ исходного градуировочного раствора ивермектина с концентрацией 100 мкг/$см^3$ (п. 7.5.1.), разбавляют ацетонитрилом до метки. Раствор хранится в морозильной камере в течение 10-ти дней.

Этот раствор используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения ивермектина из исследуемых образцов.

7.5.3. Рабочие растворы № 2 – 5 ивермектина для градуировки (концентрация 0.005 - 0.1 мкг/$см^3$)

В 4 мерные колбы вместимостью 100 $см^3$ помещают по 0.5, 1.0, 5.0 и 10,0 $см^3$ стандартного раствора №1 с концентрацией 1 мкг/$см^3$ (п. 7.5.2.), доводят до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2 - 5 с концентрацией ивермектина 0.005, 0.01, 0.05 и 0.10 мкг/$см^3$, соответственно.

Растворы хранятся в морозильной камере не более недели.

7.6. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (mV x сек) от концентрации ивермектина в растворе (мкг/$см^3$), устанавливают методом

абсолютной калибровки по 4-м растворам флуорогенного производного ивермектина для градуировки.

Для построения градуировочной харатеристики в градуированные пробирки вместимостью 5 $см^3$ вносят по 1 $см^3$ каждого из 4-х рабочих растворов ивермектина №№ 2-5, прибавляют по 0,1 $см^3$ 1-N-метилимидазола, перемешивают. Смесь охлаждают до 0-5^{0}С, помещая пробирки с ледяную баню, добавляют по каплям 0,3 $см^3$ реактива для дериватизации (п.7.4), перемешивают и выдерживают час при комнатной температуре.

В инжектор хроматографа вводят по 20 $мм^3$ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

7.7. Подготовка патрона для очистки экстрактов

Патрон для твердофазной экстракции устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума*, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом Льюера объемом не менее 10 $см^3$, используемый в качестве емкости для элюента.

Концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ метанола, высушивают пропусканием воздуха (с использованием вакуума) в течение 5 мин. Затем через патрон пропускают 5 $см^3$ гексана. Процедуру проводят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин, при этом нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

*** Примечание:** В отсутствии специального аллонжа, жидкость продавливают через патрон с помощью шприца, скорость прохождения раствора не должна превышать 1-2 капли в сек.

8. Отбор проб

Отбор проб осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТов на исследуемые продукты: ГОСТ 7269-79 «Мясо».

Обобранные образцы продуктов герметично упаковывают в полиэтиленовые мешки, стеклянные банки с притертыми крышками. Образцы анализируют непосредственно после отбора проб или хранят в морозильной камере при –20°С (допускается хранение до 2-х месяцев).

Непосредственно перед анализом образцы размораживают, пробы органов и тканей массой 200 – 300 г тщательно измельчают с использованием гомогенизатора. Пробу гомогенизированного образца печени, почек и мяса массой 10 г, жира массой 5 г взвешивают на аналитических весах в плоскодонных колбах вместимостью 250 $см^3$.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

К пробе гомогенизированного образца (10 г печени, почек, мяса, 5 г жира), помещенной в колбу вместимостью 250 $см^3$, приливают 100 $см^3$ этилацетата, тщательно перемешивают путем встряхивания, выдерживают на ультразвуковой бане 5 мин, помещают на встряхиватель на 30 мин, дополнительно выдерживают на ультразвуковой бане 5 мин и снова помещают на встряхиватель на 30 мин.

Надосадочную жидкость переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$, фильтруя ее через тампон из стекловаты, помещенный в конусную химическую воронку. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 40^0С. Остаток растворяют в 30 $см^3$ гексана, переносят в делительную воронку вместимостью 150 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ ацетонитрила, интенсивно встряхивают в течение 1 мин. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой сливают в круглодонную колбу. В воронку добавляют новую порцию ацетонитрила объемом 20 $см^3$, вновь интенсивно встряхивают в течение 1 мин. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой сливают в круглодонную колбу, объединяя его с первым экстрактом, и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 40^0С. Сухой остаток растворяют в 30 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода (1:1), помещая на ультразвуковую баню на 1 мин. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, добавляют 10 $см^3$ насыщенного раствора хлористого натрия, 70 $см^3$ гексана, интенсивно встряхивают воронку в течение 1 мин. Верхний органический слой собирают в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$. Водно-ацетонитрильную фазу вновь переносят в делительную воронку и повторяют операцию экстракции, используя 70 $см^3$ гексана.

Объединенную органическую фазу упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не более 40^0С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила и подвергают дериватизации по п. 9.2.

9.2. Дериватизация

К ацетонитрильному раствору прибавляют 0,1 $см^3$ 1-N-метилимидазола, перемешивают. Смесь охлаждают до 0-5^{0}С, помещая колбу в ледяную баню, добавляют по каплям 0,3 $см^3$ реактива для дериватизации (п.7.4), перемешивают и выдерживают 1 час при комнатной температуре.

Дериватизированные экстракты подвергают очистке по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта

Аликвоту раствора после дериватизации объемом 0,7 $см^3$ переносят в градуированную пробирку вместимостью 5 $см^3$, добавляют 5 $см^3$ гексана, интенсивно встряхивают в течение 1 мин, верхний гексановый слой отбирают с помощью пипетки, перенося в стакан вместимостью 50 $см^3$, операцию экстракции повторяют новой порцией гексана объемом 5 $см^3$. Верхний гексановый слой также переносят в химический стакан, объединяя с первым экстрактом. Объединенный гексановый экстракт вносят на патрон для твердофазной экстракции Florisil Sep Pak, подготовленный по п. 7.7. Скорость прохождения раствора через патрон не должна превышать 1-2 капли в сек. Элюат собирают непосредственно в круглодонную колбу.

Флуорогенное производное ивермектина дополнительно элюируют с патрона 5 $см^3$ гексана, также объединяя элюат с первой порцией в круглодонной колбе. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35^{0}С. Остаток в колбе растворяют в 1,4 $см^3$ ацетонитрила и анализируют на содержание ивермектина по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,0 мм, содержащая Zorbax ODS, зернением 5 мкм

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: метанол-вода (98:2, по объему)

Скорость потока элюента: 2 $см^3$/мин

Длина волны: возбуждение 364 нм

эмиссия 470 нм

Показание аттенюатора: 64

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$

Ориентировочное время выхода флуорогенного производного ивермектина: около 10 мин.

Образцы, дающие пики, большие, чем стандартный раствор ивермектина с концентрацией 0,1 мкг/см^3, разбавляют ацетонитрилом.

10. Обработка результатов анализа

Содержание ивермектина в пробе рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{(A \times K)}{m}, \text{ где}$$

X - содержание ивермектина в пробе, мг/кг;

A - концентрация ивермектина, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3;

m - масса анализируемого образца, г;

K – коэффициент пересчета, учитывающий объем реакционной смеси после дериватизации, используемый для анализа, равный 2.

11. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с рекомендациями МИ 2335-95. ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

12. Разработчики.

Юдина Т.В., д.б.н., проф. зав. лаб., Федорова Н.Е., д.б.н., вед. научн. сотр., Волкова В.Н. к.х.н., научн. сотр.

Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана (ФНЦГ им.Ф.Ф.Эрисмана)

141000, г. Мытищи Московской обл., ул. Семашко, д. 2, лаборатория аналитических методов контроля.

Телефон: (095) 586-1276

gost.e-ecolog.ru