Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение массовой концентрации аверсектина С в продуктах питания растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды) и в органах и тканях животных, плазме и молоке методом флуоресцентной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Сборник методических указаний
МУК 4.1.1011—01—4.1.1012—01

Издание официальное

Минздрав России
Москва • 2001

gost.e-ecolog.ru

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение массовой концентрации аверсектина С в продуктах питания растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды) и в органах и тканях животных, плазме и молоке методом флуоресцентной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Сборник методических указаний
МУК 4.1.1011—01—4.1.1012—01

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** массовой концентрации аверсектина С в продуктах питания растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды) и в органах и тканях животных, плазме и молоке методом флуоресцентной высокоэффективной жидкостной хроматографии: Сборник методических указаний.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001.—23 с.

ISBN 5—7508—0273—6

1. Разработаны ООО НБЦ «Фармбиомед» (В. Г. Тер-Симонян, С. В. Авчук).
2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по госсанэпиднормированию при Минздраве России (протокол № 5 от 26.12.00).
3. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации – Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации 22 января 2001 г.
4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 5—7508—0273—6

© Минздрава России, 2001
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации – Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
22 января 2001 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение массовой концентрации аверсектина С в органах и тканях животных, плазме и молоке методом флуоресцентной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1012—01

1. Назначение и область применения

Настоящие методические указания методом хроматографии устанавливают количественный анализ продуктов питания животного происхождения (органы и ткани животных, плазма, молоко) на содержание аверсектина С с нижним пределом измерения 0,001 мг/кг и предназначены для проведения лабораторных исследований безопасности пищевой продукции учреждениями госсанэпидслужбы Российской Федерации, а также для предприятий и учреждений, осуществляющих контроль качества пищевых продуктов в соответствии с Санитарными правилами и нормами «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.560—96» и аккредитованных в установленном порядке.

2. Характеристика вещества

2.1. Структурная формула основных компонентов аверсектина С – авермектинов B_1 и B_2

R_{26}	$C_{22} \times C_{23}$
B_1 C_2H_5 или CH_3	–CH=CH–
B_2 C_2H_5 или CH_3	$–CH_2–CHOH$

2.2. Эмпирическая формула:

для **B_1** $C_{48}H_{72}O_{14}$
или $C_{47}H_{70}O_{14}$
для **B_2** $C_{48}H_{74}O_{15}$
или $C_{47}H_{72}O_{15}$

2.3. Молекулярная масса:

для **B_1** 872 или 858
для **B_2** 890 или 876

2.4. Регистрационный номер по CAS:

B_{1a} 65195–55–3 B_{2a} 65195–57–5
$B_{1в}$ 65195–56–4 $B_{2в}$ 65195–58–6

2.5. Физико-химические свойства

Аверсектин С – противопаразитарный препарат, представляющий собой комплекс близких в химическом отношении веществ – авермектинов, образуемых культурой Str. avermitilis (см. формулу).

Аверсектин С – порошок белого или желтовато-белого цвета, легко растворим в хлорированных углеводородах, ацетоне, бензоле, растворим в низших спиртах, практически не растворим в воде, петролейном эфире. $T_{пл.}$ – 150 °С с разложением.

Основными компонентами авермектинового комплекса являются авермектины B_1 и B_2, содержание которых в комплексе составляет не менее 65 % всего авермектинового комплекса. Агрегатное состояние в воздухе – аэрозоль.

2.6. Токсикологическая характеристика

Аверсектин С обладает нервно-паралитическим действием. Класс опасности – первый. Предельно допустимая доза аверсектина С в продуктах питания животного происхождения 0,004 мг/кг.

3. Погрешность измерения

Метод обладает специфичностью. Суммарная погрешность измерений не превышает 10 % при доверительной вероятности – 0,95.

4. Метод измерений

Измерения массовой концентрации аверсектина С основаны на использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением флуоресцентного детектора на колонке с обращенной фазой после экстракции его органическими растворителями из ор-

ганов и тканей животных, плазмы и молока с последующей очисткой экстрактов и получением флуоресцирующих производных путем обработки трифторуксусным ангидридом в растворе ацетонитрила в присутствии 1-метил-имидазола. Детектирование ведут по интенсивности флуоресценции при длинах волн возбуждения и эмиссии 365 и 470 нм соответственно.

Чувствительность метода составляет 0,71 нг в пробе, нанесенной на колонку.

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

Аналитический хроматограф, модель Du Pont 8800 (США) или аналогичный с флуоресцентным детектором, инжектором с объемом дозирующей петли 20 мкл, с компьютерной системой обработки хроматографических данных (или с интегратором)	
Колонка аналитическая 250 × 4, с предколонкой 50 × 4 мм, заполненные обращенной фазой Диасорб 130-Сс 16Т, с размером частиц 6 мкм	
Весы аналитические 2 класса точности	ГОСТ 24104—88
Весы микроаналитические, точность взвешивания до 4 десятичного знака, Cahn (США) или аналогичные	
Центрифуга, центрифужные полиэтиленовые пробирки, вместимостью 50 и 15 мл	
Ультразвуковой диспергатор УЗДН-1М	
Миксер или гомогенизатор	
Холодильник	
Аппарат для упаривания – Vortex Evaporater и др.	
Роторный испаритель	
Сушильный шкаф	
Автоматические пипетки	ТУ 64—1—3329—81
Колбы мерные, вместимостью 100 мл	ГОСТ 1770—74
Цилиндры градуированные, вместимостью 100 мл	ГОСТ 1770—74
Делительные воронки, емкостью 2 л	ГОСТ 25336—82
Пробирки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Круглодонная колба, емкостью 1 л, для роторного испарителя	

Колбы плоскодонные, вместимостью 5 л, 2 л	ГОСТ 1770—74
Ацетон, ч. д. а.	ГОСТ 2603—63
Гексан, ч.	ТУ 6—09—33—75—78
Изооктан (импортный)	
Этилацетат (импортный)	
Спирт этиловый	ГОСТ 5964—84
Спирт метиловый	ГОСТ 6995—67
Ацетонитрил, хроматографически чистый или импортный	ТУ ИРЕА 22—66
1-метилимидазол импортный, фирма МЕРК	
Трифторуксусный ангидрид, импортный, фирма МЕРК	
Стандартный образец авермектина B_1 (абамектина), с активностью 938 мкг/мг, содержащий 88,9 % авермектина B_{1a} и 5,3 % авермектина B_{1b}, поставляемый ВГНКИ контроля, стандартизации и сертификации ветпрепаратов	РСО 9340—202—00494189

6. Требования безопасности

6.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТу 12.1.005—88.

6.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают меры противопожарной безопасности по ГОСТу 12.1.004—76.

6.3. При выполнении измерений с использованием хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТом 12.1.019—79 и инструкции по эксплуатации прибора.

7. Требования к квалификации оператора

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

8. Условия измерений

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

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

9. Подготовка к выполнению измерения

9.1. Приготовление растворов

9.1.1. *Стандартный раствор авермектина B_1 (абамектина) с концентрацией 200 мкг/мл – раствор № 1* – готовят путем растворения точной навески стандартного образца в метиловом спирте. Раствор хранится в течение 2 мес в холодильнике. *Рабочий стандартный раствор с концентрацией 2 мкг/мл – раствор № 2* – готовят путем разведения раствора № 1 метиловым спиртом. Раствор хранят 2 недели в холодильнике.

9.1.2. *Раствор элюента* готовят путем смешивания метилового спирта с водой в соотношении 98 : 2.

9.2. Подготовка прибора

Общую подготовку прибора осуществляют согласно инструкции по эксплуатации.

9.3. 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 градуировочных растворов, которые готовят согласно таблице 1 в пробирках с притертыми пробками.

Таблица 1

Растворы для установления градуировочной характеристики

Номер стандарта	Стандартный раствор № 2, мкл	Этиловый спирт, мкл	Содержание авермектина B_1, нг/мл	Количество в-ва, наносимого на колонку, нг
0	0	1000	–	–
1	10	990	20	0,71
2	20	980	40	1,43
3	30	970	60	2,14
4	40	960	80	2,86
5	50	950	100	3,57

Проведение дериватизации проб

Из приготовленных растворов отбирают по 0,5 мл, переносят в чистые стеклянные пробирки и упаривают досуха на Vortex'е при температуре 40—50 °С.

В пробирки с сухим остатком вносят по 0,5 мл ацетонитрила. Пробирки энергично встряхивают и обрабатывают ультразвуком в течение 30 с. Процедуру повторяют дважды, чтобы полностью перевести в раствор авермектины, адсорбированные на стенках пробирки. Пробирки помещают в холодильник на 10—15 мин.

Примечание: *необходимо следить, чтобы в образцы перед проведением дериватизации не попала влага.*

В пробирки с подготовленным ацетонитрильным раствором после растворения вносят с помощью градуированной микропипетки или микрошприца 0,05 мл 1-метилимидазола. Пробирки закрывают, тщательно перемешивают содержимое в течение 5—10 с, обрабатывают ультразвуком, центрифугируют и помещают в холодильник при 0 °С на 10—15 мин.

Готовят реакционную смесь из трифторуксусного ангидрида и ацетонитрила в соотношении 1:2 и помещают ее в холодильник при 0 °С на 10—15 мин.

Примечание: *пользуются только свежеприготовленной реакционной смесью.*

После охлаждения в пробирки с образцами вносят по 0,15 мл охлажденной смеси трифторуксусного ангидрида с ацетонитрилом. Пробирки закрывают, перемешивают содержимое и выдерживают в холодильнике в течение 1 ч.

На аналитическую колонку наносят по 50 мкл подготовленных дериватизированных стандартных образцов, содержащих 0,71; 1,43; 2,14; 2,86; 3,57 ng авермектина B_1.

Подвижная фаза – метиловый спирт – вода 98 : 2.

Скорость потока – 0,8 см^3/мин. Давление – 120—160 атм.

Детектирование ведут по интенсивности флуоресцентности при длинах волн возбуждения и эмиссии 365 и 470 нм соответственно.

Калибровочную кривую строят по сумме площадей двух компонентов стандарта. Полную градуировку проводят не реже одного раза в месяц. Для ежедневной градуировки используют только два раствора с концентрацией авермектина B_1 20 и 60 нг/мл.

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 –20 °С (допускается хранение до 2-х месяцев).

9.5. Подготовка проб к определению

9.5.1. Экстракция и очистка экстрактов

Органы и ткани. Пробу ткани, хранившуюся в холодильнике, размораживают, мелко измельчают в гомогенизаторе (или острыми ножницами). Навеску измельченной ткани (5 г) помещают в плоскодонную колбу с пришлифованной пробкой, емкостью 100 мл, куда добавляют 30 мл этилацетата.

Экстракцию проводят в течение 24 ч, после чего экстракт отделяют центрифугированием и переносят его через фильтр с безводным Na_2SO_4 в круглодонную колбу. К остатку добавляют еще 20 – 30 мл этилацетата и проводят вторую экстракцию в течение 1 ч (при встряхивании). Экстракт отделяют центрифугированием и через фильтр с безводным Na_2SO_4 переносят в круглодонную колбу с первым экстрактом. Экстракты упаривают на роторном испарителе при температуре 40—50 °С досуха, остаток растворяют в 10 мл сухого ацетонитрила. Растворение ведут в ультразвуковой бане. Раствор переносят в делительную воронку. Колбу, где находился сухой остаток, обмывают 5 мл ацетонитрила, который также переносят в делительную воронку.

Ацетонитрильный раствор 4 раза промывают гексаном, беря на каждую промывку по 5—8 мл гексана. Гексановые экстракты отбрасывают.

Примечание: *экстракцию гексаном можно проводить в пробирках со шлифом, отбирая гексановый экстракт пипеткой.*

Измеряют объем ацетонитрильного раствора, промытого гексаном, и делят его на равные части. Одну из них помещают в холодильник на случай возникновения необходимости в повторении анализа. Вторую часть раствора помещают в пробирку и упаривают на Vortex'е в токе азота досуха (допускается упаривание ацетонитрильного раствора на роторном испарителе при температуре не выше 50 °С). Сухой остаток используют для проведения дериватизации.

Плазма. 1,0 мл плазмы крови помещают в гомогенизатор (Super-Mixer), туда же добавляют 3 мл смеси этиловый спирт – вода в соотношении 1 : 1. Обработку ведут при 4500 об/мин в течение 10 мин. Из полученной эмульсии аверсектин экстрагируют этилацетатом 3 раза порциями по 8 мл. Экстракцию ведут в центрифужных пробирках при встряхивании с последующим центрифугированием. Этилацетатные экстракты (верхний слой) отбирают пипеткой и переносят в круглодонную колбу, вместимостью 100 мл. Этилацетат отгоняют в вакууме на роторном испарителе при температуре не выше 50 °С. Остаток растворяют в 4 мл ацетонитрила (растворение ведут на ультразвуковой бане). Раствор переносят в широкую пробирку с притертой пробкой. Колбу, в которой производилась отгонка этилацетата, обмывают 2 мл ацетонитрила и промывку также переносят в пробирку. Ацетонитрильный раствор 3—5 раз промывают 3—4 мл гексана. Гексановые экстракты (верхний слой) отбирают пипеткой и отбрасывают, а ацетонитрильный раствор, промытый гексаном, делят на две равные части. Одну часть хранят в холодильнике, а вторую часть помещают в центрифужную пробирку, упаривают в токе азота в системе Vortex досуха (допускается упаривание ацетонитрильных растворов на роторном испарителе при температуре не выше 50 °С). Сухой остаток используют для проведения дериватизации.

Молоко. 1,0 мл молока помещают в гомогенизатор (Super-Mixer), туда же добавляют 5 мл смеси ацетон-вода в соотношении 1 : 1 и обрабатывают в течение 5 мин при 4500 об/мин. Из полученной эмульсии аверсектин экстрагируют изооктаном. Экстракцию проводят дважды, беря на каждую экстракцию по 5 мл изооктана. Экстракцию ведут при встряхивании и последующем центрифугировании. Экстракты объединяют и упаривают на роторном испарителе досуха. Остаток растворяют в 8 мл ацетонитрила. Ацетонитрильный раствор трижды экстрагируют 5 мл гексана (промывку гексаном можно проводить в пробирках со шлифами, отбирая каждый раз пипеткой верхний слой). Гексановые экстракты отбрасывают. Ацетонитрильный раствор делят на две равные части. Одну из них хранят в холодильнике для повторного анализа (в случае необходимости), вторую часть помещают в центрифужную пробирку и упаривают в токе азота в системе Vortex досуха (допускается упаривание на роторном испарителе). Сухой остаток используют для проведения дериватизации.

9.5.2. Проведение дериватизации

В пробирки с сухими остатками вносят по 0,5 мл ацетонитрила и растворяют остатки с помощью ультразвука. Дериватизацию исследуемых проб проводят так, как это описано для стандартных образцов.

Примечание: *дериватизацию авермектинов исследуемого образца (образцов) проводят одновременно с дериватизацией рабочих стандартов. Допускается хранение дериватизированных проб в холодильнике в течение одних суток.*

10. Выполнение измерений

Анализ ВЭЖХ 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 50 мкл. Режим хроматографирования такой же, как это описано для стандартного образца.

11. Расчет концентраций

На хроматограммах исследуемых образцов измеряют площадь пиков производных по времени удерживания соответствующих стандарту B_1.

По калибровочному графику находят содержание авермектина B_1 в объеме инжектированной пробы испытуемого образца.

Содержание аверсектина С в исследуемом образце ведут по формуле:

$$C_{ав} = \frac{C_{B_1} \cdot V_2 \cdot K_1}{P \cdot V_1 \cdot K_2}, \text{ где}$$

$C_{ав}$ – концентрация аверсектина С в образце, нг/г;

C_{B1} – содержание авермектина B_1 в объеме пробы, нанесенной на колонку; определяется по калибровочному графику;

V_1 – объем пробы, нанесенной на колонку, мкл (50 мкл);

V_2 – объем пробы, подготовленной для ВЭЖХ, мкл (700 мкл);

P – навеска образца, г;

K_1* – коэффициент, учитывающий все компоненты аверсектина С (2,5);

K_2** – коэффициент, учитывающий степень извлечения аверсектина С.

12. Оформление результатов анализа

Результат количественного анализа представляют в виде $C \pm \Delta$ мг/м³, $P = 0,95$, где Δ – характеристика погрешности, мг/м³, $\Delta = 0,15C + 0,0000034$ мг/м³.

13. Контроль погрешности методики

Значения полученных метрологических характеристик погрешности, норматива оперативного контроля точности и норматива оперативного контроля воспроизводимости приведены в табл. 2 в виде зависимости от значения массовой концентрации анализируемого компонента в пробе С, которую определяют как среднеарифметическое результатов параллельных определений.

Оперативный контроль воспроизводимости

Отбирают реальные навески из одной пробы испытуемого объекта. Анализируют в соответствии с прописью методики, максимально варьируя условия проведения анализа: партии реактивов, набора мерной посуды и т.д., и получают два результата C_1 и C_2 анализов. Результаты анализа не должны отличаться друг от друга на величину большую, чем норматив оперативного контроля воспроизводимости D:

$$|C_1 - C_2| < D$$

При превышении расхождения между двумя результатами норматива оперативного контроля воспроизводимости эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

---

* Коэффициент K_1 выведен на основании данных о содержании авермектина B_1 в авермектиновом комплексе – аверсектине С. Содержание его составляет (40 ± 5) %.

** Коэффициент K_2, учитывающий степень извлечения авермектинового комплекса из объектов, получен при постановке модельных опытов с внесением в объекты известных количеств аверсектина С.

Таблица 2

Результаты метрологической аттестации методики КХА

Диапазон определяемых концентраций аверсектина С мг/кг	Наименование метрологической характеристики	
	Характеристика погрешности, мг/кг; P = 0,95	Норматив оперативного контроля воспроизводимости D, мг/кг; P = 0,95, m = 2
Мышцы 0,004 до 0,024	0,095C + 0,00029	0,095C + 0,00047
Жир 0,004 до 0,24	0,10C + 0,00026	0,11C + 0,00043
Печень 0,004 до 0,024	0,065C + 0,00042	0,034C + 0,00075
Почки 0,004 до 0,024	0,084C + 0,00011	0,064C + 0,00024
Молоко 0,004 до 0,024	0,062C + 0,00036	0,006C + 0,00082

14. Нормы затраты времени на анализ

Для проведения анализов из 3 образцов требуется 6 ч.

Определение массовой концентрации аверсектина С в продуктах питания растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды) и в органах и тканях животных, плазме и молоке методом флуоресцентной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Сборник методических указаний
МУК 4.1.1011—01—4.1.1012—01

Редактор Барабанова Т. Л.
Верстка Юшкова Т. Г.
Технический редактор Климова Г. И.

Подписано в печать 28.04.01

Формат 60x88/16 **Печ. л. 1,5**
Заказ 14

Тираж 500 экз.

ЛР № 021232 от 23.06.97

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Издательским отделом
Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11.
Отделение реализации, тел. 198-61-01

gost.e-ecolog.ru