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

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 продуктах питания растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды) методом флуоресцентной высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания

МУК 4.1.1011—01

1. Назначение и область применения

Настоящие методические указания методом хроматографии устанавливают количественный анализ продуктов питания растительного происхождения (овощи, фрукты, ягоды) на содержание аверсектина С с нижним пределом измерения 0,005 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 «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.

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.

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 растительного происхождения 0,005 мг/кг.

3. Погрешность измерения

Метод обладает специфичностью. Суммарная погрешность измерений не превышает 10 % при доверительной вероятности – 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 растительной пробы. Очистку экстракта ведут на концентрирующих

патронах Диапак С-8 и Диапак-амино с 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

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 или аналогичный	
Миксер или гомогенизатор	
Холодильник	
Хроматограф, модель Du Pont 8800 (США) или аналогичный	
Флуоресцентный детектор фирмы Kratos-Sthoeffel модель FS-950 (Великобритания) или аналогичный	
Персональный компьютер или интегратор с самописцем фирмы LKB BD-41 (Швеция) или аналогичный	
Колонка аналитическая Диапак-130-С 16Т 250 × 4, с размером частиц 6 мкм (фирма БиоХимМак, Россия) или аналогичная	
Патроны Диапак С-8 и С-16, Диапак-амино (фирма «БиоХимМак», Россия) или аналогичные	
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
Спирт этиловый	ГОСТ 5964—84
Спирт метиловый	ГОСТ 6995—67
Ацетонитрил, хроматографически чистый	ТУ ИРЕА 22—66
1-метилимидазол импортный, фирма МЕРК	
Трифторуксусный ангидрид, импортный, фирма МЕРК	
Авермектин B_1 (абамектин) – стандартный образец. РСО 9340—202—00494189 с активностью 938 мкг/мг, содержащий 88,9 % авермектина B1a и 5,3 % авермектина B1в, поставляемых ВГНКИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов	

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 табл. 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

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.

9.4. Отбор проб

Овощи, фрукты, ягоды. 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).

Отобранные для анализа овощи и фрукты моют, высушивают и готовят усредненную пробу в количестве 300—500 г.

Усредненную пробу гомогенизируют, переносят в новый полиэтиленовый пакет, быстро замораживают и хранят в морозильнике (до начала анализов), но не более 1—2 дней. До начала анализов не допускается размораживание проб.

Примечание: *при отсутствии возможности быстрого замораживания можно провести их фиксацию небольшим количеством этилового спирта*

9.5. Подготовка проб к определению

9.5.1. Экстракция и очистка экстрактов

Овощи, фрукты, ягоды. Взвешивают точно 5,0 г гомогенизированной массы. Навеску помещают в центрифужный стакан, емкостью 50 мл.

К навеске, находящейся в центрифужном стакане, добавляют пипеткой 10 мл метилового спирта. Суспензию тщательно перемешивают стеклянной палочкой в течение 30 с, после чего центрифугируют при 6000 об/мин в течение 15 мин.

Экстракт (супернатант) осторожно переносят в градуированный цилиндр с притертой пробкой, вместимостью 100 мл.

В центрифужный стакан с твердым остатком вносят еще 10 мл метилового спирта. Смесь тщательно перемешивают и центрифугируют.

Второй экстракт объединяют с первым в цилиндре. К объединенным экстрактам добавляют деионизированную (или дистиллированную) воду, до 100 мл. Цилиндр закрывают притертой пробкой и перемешивают не встряхивая.

Примечание: *важно, чтобы содержание воды в смеси было не менее 70%.*

Готовят к работе патрон Диапак С-8, для чего к патрону, снабженному адаптером, присоединяют резервуар, вместимостью не менее 150 мл. Патрон с резервуаром присоединяют к вакуумной системе и промывают патрон последовательно 5 мл метилового спирта и 5 мл дистиллированной или деионизированной воды.

Водно-метанольный раствор переносят в резервуар, соединенный с патроном, подключают вакуум и пропускают раствор со скоростью

10 мл/мин. Раствор после патрона отбрасывают. Патрон осушают и отключают вместе с резервуаром от вакуумной установки.

Готовят к работе патрон Диапак-амино, для чего патрон промывают 5 мл метилового спирта.

Патрон Диапак С-8 вместе с резервуаром укрепляют над патроном Диапак-амино, подключают к вакуумной системе.

Цилиндр, в котором находился водно-метанольный раствор, обмывают 10 мл метилового спирта, и количественно переносят метиловый спирт в резервуар. Подключают вакуум и пропускают спирт через оба патрона.

Элюат собирают в центрифужную пробирку, вместимостью 15 мл и упаривают в вакууме на Vortex'е при температуре 40—50 °С досуха.

Примечание: *вместо резервуара и вакуумной системы для подачи раствора на патроны можно использовать шприцы, вместимостью 20 мл.*

9.5.2. Проведение дериватизации проб

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

Примечание: *дериватизацию авермектинов исследуемого образца (образцов) проводят одновременно с дериватизацией рабочих стандартов. Допускается хранение дериватизационных 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 растительных 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 растительного 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 С ± Δ мг/м³, Р = 0,95, где Δ – характеристика погрешности, мг/м³, Δ = 0,15С + 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.

---

* 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 растительных объектов, получен при постановке модельных опытов с внесением в растительные 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
Картофель 0,005 до 0,015	0,14C + 0,00023	0,19C + 0,00022
Капуста 0,005 до 0,015	0,13C + 0,00013	0,15C + 0,00024
Огурцы 0,005 до 0,015	0,046C + 0,00056	0,011C + 0,000915
Томаты 0,005 до 0,015	0,14C + 0,00016	0,19C + 0,00024
Яблоки 0,005 до 0,015	0,04C + 0,00056	0,004C + 0,00095
Черная смородина 0,005 до 0,015	0,03C + 0,00073	0,06C + 0,0000009
Перец 0,005 до 0,015	0,12C + 0,00031	0,14C + 0,000067
Баклажаны 0,005 до 0,015	0,10C + 0,000030	0,10C + 0,000051

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.

14. Нормы затраты времени на анализ

Для проведения анализов из 3-х 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