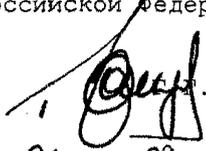


УТВЕРЖДАЮ

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

  
А. А. Онищенко  
« 02 » 02 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

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 клозантела 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:

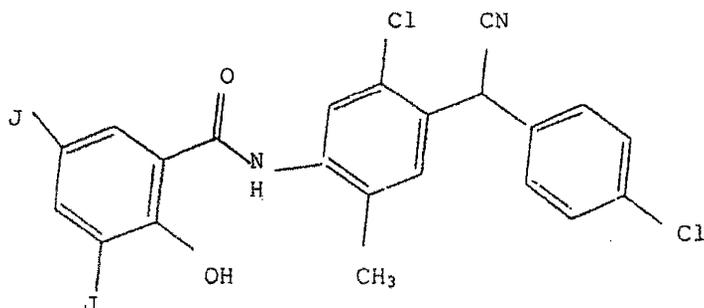
663,08

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

#### МУК 4.1

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

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



Клозантел относится к умеренно опасным веществам 3 класса опасности: ЛД<sub>50</sub> 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<sup>3</sup>, 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 250x4 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<sub>11</sub> (фирма «БиоХимМак», Россия);
- сцинтилляционные 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 НБЦ «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 легко воспламеняющимися 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  $(20 \pm 10)$  °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.

## МУК 4.1

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<sup>3</sup> раствора содержалось 4 мг клозантела. Раствор хранению не подлежит.

Из основного раствора следующие разведения градуировочных растворов: в стеклянные пробирки объемом 5 см<sup>3</sup> вносят 1,0; 0,5; 0,1; 0,02 и 0,01 см<sup>3</sup> основного раствора и доводят объем до 1 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup>. На аналитическую колонку наносят по 0,05 см<sup>3</sup> подготовленных растворов.

##### Условия детектирования:

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

Скорость потока - 1 см<sup>3</sup>/мин; давление 120-160 бар.

Чувствительность детектора - 0,05.

Длина волны - 237 нм.

## МУК 4.1

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  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$  (допускается хранение до 2-х месяцев).

Кровь отбирают в пробирки с гепарином и центрифугируют. Супернатант хранят в морозильнике при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 10.5 Подготовка проб к определению

#### 10.5.1 Экстракция и очистка экстрактов

##### Плазма

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

Раствор используют для хроматографии.

### **Мышцы, почки и печень**

Полученные пробы ткани выдерживают в морозильной камере при  $T = -18^{\circ}\text{C}$  в течение 1 суток. Затем медленно оттаивают при  $T = 4^{\circ}\text{C}$  в течение 12 часов. Пробы вновь замораживают при  $T = -18^{\circ}\text{C}$  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<sup>3</sup> 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 сцинтилляционный флакон объемом 20 см<sup>3</sup>, остаток повторно экстрагируют 4 см<sup>3</sup> ацетонитрила и упаривают досуха в вакуумном сушильном шкафу при температуре 45°C (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<sup>3</sup> ацетонитрила. Ацетонитрильный раствор трижды промывают 3 см<sup>3</sup> гексана. Гексановые экстракты отбрасывают, а ацетонитрильный раствор упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 см<sup>3</sup> 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 уравнивают 5 см<sup>3</sup> ацетонитрила. На патрон наносят образец экстракта из печени объемом 1 см<sup>3</sup> и элюируется 5 см<sup>3</sup> ацетонитрила. Элюат упаривают досуха при температуре 45°C. Сухой остаток растворяют 1 см<sup>3</sup> 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.

#### МУК 4.1

Объем наносимой на колонку пробы для всех объектов составляет 0,05 см<sup>3</sup>.

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:

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

С<sub>кп.</sub> - концентрация клозантела в образце, мкг/см<sup>3</sup>;

С<sub>кп.и</sub> - содержание клозантела в объеме инжектируемой пробы образца, определяют по графику, мкг;

V<sub>1</sub> - объем пробы, нанесенной на колонку, см<sup>3</sup> (0,05 см<sup>3</sup>)

V<sub>2</sub> - объем пробы, подготовленной для ВЭЖХ, см<sup>3</sup> (1 см<sup>3</sup>);

V<sub>3</sub> - 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)