ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 13493— 2005

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения содержания хлорамфеникола (левомицетина) с помощью жидкостной хроматографии

ISO 13493:1998
Meat and meat products — Determination of chloramphenicol content — Method using liquid chromatography
(IDT)

Издание официальное

БЗ 12—2005/348

Москва
Стандартинформ
2006

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГУ ВНИИПП Россельхозакадемии) на основе собственно аутентичного перевода, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 116 «Продукты переработки птицы, яиц и сублимационной сушки»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 16 декабря 2005 г. № 314-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 13493:1998 «Мясо и мясные продукты. Определение содержания хлорамфеникола. Метод жидкостной хроматографии» (ISO 13493:1998 «Meat and meat products — Determination of chloramphenicol content — Method using liquid chromatography»). Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2004 (пункт 3.5).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных (региональных) стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении Б

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет

© Стандартинформ, 2006

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения содержания хлорамфеникола (левомицетина) с помощью жидкостной хроматографии

Meat and meat products.
Method for determination of chloramphenicol content using liquid chromatography

Дата введения — 2007—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения с помощью жидкостной хроматографии содержания хлорамфеникола в мышечной ткани мяса, включая мясо птицы, где массовая доля хлорамфеникола составляет не менее 6,5 мкг/кг.

Данный метод неприменим к испорченным образцам.

Примечание — Настоящий стандарт допускается применять для определения содержания хлорамфеникола во всех видах мяса и мясопродуктов. Однако межлабораторные испытания по установлению точности метода были проведены только на образцах мышечной ткани.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ИСО 3100-1:1991 Мясо и мясные продукты. Методы отбора и подготовки образцов. Часть 1. Отбор образцов

ИСО 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний

ИСО 5725-1:1994 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ИСО 5725-2:1994 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

3.1 содержание хлорамфеникола в мясе и мясных продуктах: Массовая доля хлорамфеникола, измеренная с помощью метода, установленного в настоящем стандарте.

Примечание — Содержание хлорамфеникола выражают в микрограммах на килограмм.

4 Сущность метода

Хлорамфеникол из пробы экстрагируют водой. Экстракт фильтруют и полученный водный раствор очищают от липофильных компонентов методом твердофазной экстракции. Хлорамфеникол элюируют с экстракционного патрона дихлорметаном. Органический растворитель выпаривают и остаток очищают с помощью жидко-жидкостной экстракции в системе вода-толуол. Хлорамфеникол определяют методом обращенно-фазной хроматографии с детектированием в ультрафиолетовой (УФ) области спектра.

Издание официальное

5 Реактивы

При отсутствии специальных указаний используют реактивы только признанных аналитических марок.

5.1 Вода должна соответствовать требованиям квалификации не ниже 3-й степени чистоты согласно ИСО 3696. Вода не должна содержать органические примеси.

5.2 Азот, пригодный для выпаривания растворителей.

5.3 Дихлорметан.

5.4 Толуол.

5.5 Ацетатный буфер, c (CH_3CO_2Na) = 0,01 моль/дм^3, pH = 4,3.

Растворяют 0,82 г безводного ацетата натрия примерно в 970 см^3 воды. С помощью pH-метра (6.1) доводят pH до 4,3 добавлением раствора уксусной кислоты массовой долей 50 %. Переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 см^3. Доводят водой до метки и перемешивают.

5.6 Ацетонитрил для УФ спектроскопии.

5.7 Подвижная фаза.

К 250 см^3 ацетонитрила (5.6) добавляют 750 см^3 ацетатного буфера (5.5) и тщательно перемешивают.

Перед использованием элюент фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм (6.2) и дегазируют.

5.8 Основной раствор хлорамфеникола массовой концентрации 100 мкг/см^3.

Взвешивают 10 мг хлорамфеникола с точностью 0,1 мг и переносят навеску в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Добавляют метанол до метки и перемешивают.

Приготовленный основной раствор стабилен в течение 1 мес при хранении в темноте.

5.9 Стандартные растворы хлорамфеникола.

Пипеткой вносят 5,0 см^3 основного раствора (5.8) в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Разбавляют водой до метки и перемешивают. Разбавляют 1,0, 2,0, 5,0 и 15,0 см^3 этого раствора до 100 см^3 для получения четырех стандартных растворов с массовой концентрацией хлорамфеникола соответственно 0,05; 0,10; 0,25 и 0,75 мкг/см^3.

Эти стандартные растворы стабильны в течение одной недели при хранении в темноте.

6 Оборудование

Используют обычное лабораторное оборудование, в частности:

6.1 pH-метр

6.2 Мембранный фильтр с малым мертвым объемом и размером пор 0,22 мкм.

6.3 Механическое или электрическое устройство, пригодное для измельчения образца.

В качестве такого устройства может быть использован высокоскоростной ротационный куттер или мясорубка с решеткой, диаметр отверстий которой не превышает 4 мм.

6.4 Лабораторный гомогенизатор (например гомогенизатор типа Стомахер или Вортекс)[1)].

6.5 Фильтровальная бумага обеззоленная быстрофильтрующая диаметром примерно 15 см.

Примечание — Например, можно использовать Ватман 41[1)].

6.6 Экстракционные патроны вместимостью 20 см^3 с диатомитовой землей, которая задерживает липофильные компоненты из водных растворов.

Примечание — Можно использовать, например, картриджи Extrelut® производства фирмы Merck, Дармштадт, Германия (№ 11737)[1)].

6.7 Водяная баня или нагревательный блок, позволяющие поддерживать температуру (40 ± 1) °С и имеющие устройство для выпаривания потоком азота (5.2), или ротационный вакуумный испаритель.

6.8 Центрифужные пробирки вместимостью 25 см^3.

6.9 Смеситель для пробирок типа Вортекс, обеспечивающий частоту вращения примерно 700 мин$^{-1}$.

6.10 Центрифуга, обеспечивающая радиальное ускорение примерно 1000 g.

6.11 Микропипетки вместимостью 300 мм^3.

[1)] Это примеры коммерчески доступной продукции. Данная информация приведена только для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой этой продукции.

6.12 Жидкостной хроматограф, оборудованный:

- насосом постоянного потока;
- инжектором;
- хроматографической колонкой внутренним диаметром 3 мм, длиной 20 см, заполненную обращенной фазой C_8 или C_{18} с размером частиц 5 мкм, или другой колонкой с эквивалентными характеристиками;
- детектором УФ/ВИД, обеспечивающим измерение при длине волны 285 нм, если возможно — диодно-матричный детектором (используется для подтверждения обнаружения хлорамфеникола);
- самописцем с регулируемым диапазоном измерения или интегратором.

7 Отбор образцов

Отбор образцов не является частью метода, изложенного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора образцов приведен в ИСО 3100-1.

Очень важно, чтобы в лабораторию поступали представительные образцы, которые в процессе хранения и транспортирования не были испорчены или изменены.

От представительного образца, поступившего в лабораторию, отбирают для анализа образец массой не менее 200 г. Образец хранят в условиях, исключающих его порчу и изменение состава.

8 Подготовка образца

Доводят температуру образца до комнатной температуры. Удаляют жировую ткань и несъедобные части образца.

Измельчают образец с помощью устройства (6.3). При этом необходимо следить за тем, чтобы температура образца не превышала 25 °С. При использовании мясорубки образец пропускают через нее не менее двух раз.

Приготовленный образец помещают в герметично закрываемую емкость. Закрывают и хранят так, чтобы не допустить порчи и изменения его состава.

В случае необходимости образец хранят при температуре ниже минус 18 °С.

Анализ образца проводят как можно быстрее, но не позднее 24 ч после измельчения.

9 Проведение испытаний

Примечание — Для контроля повторяемости результатов (см. 11.2) проводят два параллельных определения в соответствии с 9.1—9.6.

9.1 Общая часть

Параллельно с анализом раствора (или серии растворов), полученного из испытуемого образца, проводят анализ раствора, полученного из образца, заведомо не содержащего хлорамфеникол (образец-бланк), и раствора, полученного из образца, в который добавлен хлорамфеникол в количестве 10 мкг/кг (образец-бланк с внесенным хлорамфениколом).

9.2 Подготовка пробы

В конической колбе вместимостью 100 см^3 взвешивают 10 г (m) измельченного образца (8) с точностью 0,1 г.

9.3 Получение экстракта

Добавляют 40,0 см^3 воды и энергично перемешивают в течение 3 мин с помощью лабораторного гомогенизатора (6.4).

Общий объем образующейся водной фазы (V_1) равен 40,0 см^3 плюс объем воды, содержащейся в пробе (обычно в 10 г пробы содержится примерно 7,5 см^3 воды).

Гомогенат фильтруют через бумажный фильтр (5).

9.4 Твердофазная экстракция

Переносят 20,0 см^3 фильтрата (V_2) в экстракционный патрон (6.6).

Через (15 ± 2) мин элюируют хлорамфеникол с помощью 70 см^3 дихлорметана (5.3). Выпаривают органическую фазу до объема примерно 1 см^3 на водяной бане (6.7) в слабом потоке азота (5.2) или с помощью ротационного вакуумного испарителя (6.7).

С помощью примерно 10 см^3 дихлорметана (5.3) переносят остаток в центрифужную пробирку (6.8).

Осторожно выпаривают досуха.

9.5 Жидко-жидкостная экстракция

К остатку добавляют 400 мм^3 воды (V_3) и 2,0 см^3 толуола (5.4) и перемешивают с умеренной интенсивностью в течение 1 мин на смесителе Вортекс (6.9) с частотой вращения примерно 700 мин$^{-1}$.

Центрифугируют в течение 5 мин на центрифуге (6.10) с радиальным ускорением 1000 g.

Пипеткой отбирают как можно больше органической фазы и отбрасывают ее.

Добавляют 1,5 см^3 толуола и перемешивают с умеренной интенсивностью в течение 1 мин на смесителе Вортекс (6.9) с частотой вращения примерно 700 мин$^{-1}$.

Центрифугируют в течение 5 мин на центрифуге (6.10) с радиальным ускорением 1000 g.

Пипеткой отбирают как можно больше органической фазы и отбрасывают ее.

Микропипеткой (6.11) переносят 300 мм^3 водной фазы в подходящий сосуд.

9.6 Хроматографический анализ

9.6.1 Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Длина волны	285 нм
Диапазон шкалы детектора	от 0,005 до 0,010 единиц оптической плотности, что соответствует полной шкале самописца
Шкала самописца	10 мВ
Скорость бумаги самописца	1,0 см/мин
Объемная скорость потока подвижной фазы (5.7)	0,6 см^3/мин
Объем анализируемого раствора, вводимый (инжектируемый) в хроматограф	100 мм^3

Примечание — Инжектируемый объем и объемная скорость потока зависят от размеров колонки.

9.6.2 Хроматографирование

После стабилизации системы жидкостного хроматографа (6.12) инжектируют растворы, полученные из образца-бланка и образца-бланка с внесенным хлорамфениколом, четыре стандартных раствора хлорамфеникола (5.9), раствор, приготовленный из испытуемого образца по 9.5, и снова стандартные растворы хлорамфеникола (5.9).

На хроматограммах образцов проверяют наличие сигнала на участке, соответствующем времени удерживания хлорамфеникола.

9.6.3 Измерение

Измеряют высоты или площади хроматографических пиков хлорамфеникола для испытуемого раствора и стандартных растворов хлорамфеникола.

Измеренные для стандартных растворов высоты или площади пиков должны линейно зависеть от содержания хлорамфеникола в этих растворах.

Примечание — С помощью диодно-матричного детектора может быть подтверждено обнаружение хлорамфеникола при его содержании в образце более 10 мкг/кг.

10 Обработка результатов измерений

Содержание хлорамфеникола w, мкг/кг, в испытуемом образце рассчитывают по формуле

$$w = \frac{h\,\rho V_1 V_3}{h_s\,m\,V_2},$$

где h — высота или площадь пика в единицах длины или площади, измеренные для испытуемого раствора;

h_s — высота или площадь пика, измеренные для одного из стандартных растворов (5.9);

ρ — содержание хлорамфеникола в стандартном растворе, мкг/см^3;

m — масса испытуемой пробы (9.2), г;

V_1 — объем водной фазы, полученной после гомогенизации по 9.3, см^3 (V_1 = 40 см^3 + объем воды в пробе, взятой на испытание);

V_2 — объем фильтрата (V_2 = 20 см^3), перенесенного по 9.4 в экстракционный патрон, см^3;

V_3 — объем воды (V_3 = 400 мм^3), добавленной по 9.5 к сухому остатку, мм^3.

Результат вычислений округляют до 0,1 мкг/кг.

Результат испытаний нельзя корректировать на открываемость. Открываемость должна быть указана в протоколе испытаний (12).

11 Требования к точности результатов измерений

11.1 Межлабораторные испытания

Точность метода была установлена с помощью межлабораторных испытаний, проведенных в соответствии с ИСО 5725-1 и ИСО 5725-2.

Результаты этой межлабораторной проверки опубликованы в [1]. Результаты этой проверки не могут быть распространены на области концентраций и на матрицы, отличные от указанных в настоящем стандарте.

Результаты другой межлабораторной проверки, приведенной в соответствии с ИСО 5725-1 и ИСО 5725-2, показывают, что открываемость для мяса, мяса птицы и мясных продуктов воспроизводима и равна примерно 55 %.

11.2 Повторяемость

Абсолютное значение разности результатов двух независимых единичных испытаний, выполненных за короткий промежуток времени одним методом для одного измельченного образца в одной лаборатории одним оператором на одном и том же оборудовании, может превышать 2,1 мкг/кг не более чем в 5 % случаев при содержании хлорамфеникола в образце 10 мкг/кг.

11.3 Воспроизводимость

Абсолютное значение разности результатов двух независимых единичных испытаний, выполненных одним методом для идентичного измельченного образца в разных лабораториях разными операторами с использованием разного оборудования, может превышать 4,9 мкг/кг не более чем в 5 % случаев при содержании хлорамфеникола 10 мкг/кг.

12 Протокол испытания

В протоколе испытания необходимо указать:

- информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- использованный метод отбора образцов (если известен);
- использованный метод испытаний с указанием ссылки на настоящий стандарт;
- условия проведения испытаний, не отраженные в настоящем стандарте или считающиеся неоднозначными, а также все имевшие место случаи, которые могут повлиять на результаты испытаний;
- полученный результат испытаний или два результата испытаний, если проводилась проверка повторяемости;
- открываемость.

Приложение А
(справочное)

Библиография

[1] Aerts M.L., Keukens H.J., Werdmuller G.A. Liquid Chromatographic Determination of Chloramphenicol Residues in Meat: Interlaboratory Study. J.AOAC, 72, (4), 1989, pp. 570—576

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(обязательное)

Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации ссылочным международным стандартам

Обозначение ссылочного международного стандарта	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 3100-1:1991	ГОСТ Р 51447-99 (ИСО 3100-1—91 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб
ИСО 5725-1:1994	ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения
ИСО 5725-2:1994	ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
ИСО 3696:1987	*

* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

УДК 637.544:006.354 ОКС 67.120.10 Н09

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, хлорамфеникол, левомицетин, жидкостная хроматография

Редактор *В.Н. Копысов*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *А.С. Черноусова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 23.12.2005. Подписано в печать 19.01.2006. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ.л. 0,93. Уч.-изд.л. 0,65. Тираж 208 экз. Зак. 29. С 2353.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «Стандартинформ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru