ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EACC)
EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33681— 2015

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение антибиотиков методом инверсионной вольтамперометрии (левомицетин, тетрациклин)

Издание официальное

Зарегистрирован
№ 11780
24 ноября 2015 г.

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» и Межгосударственным техническим комитетом МТК 534 «Обеспечение безопасности сельскохозяйственной продукции и продовольственного сырья на основе принципов НАССР»

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства по инвестициям и развитию Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации по результатам голосования в АИС МГС (протоколом от 12 ноября 2015 г. №82-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

Настоящий стандарт разработан на базе национального стандарта Республики Казахстан СТ РК 1505-2006 «Продукты пищевые. Определение антибиотиков методом инверсионной вольтамперометрии (левомицетин, тетрациклиновая группа)».

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты».

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

Содержание

1 Область применения ... 1
2 Нормативные ссылки ... 1
3 Отбор проб ... 3
4 Метод определения ... 3
5 Требования к выполнению аналитических измерений ... 4
6 Аппаратура, материалы и реактивы ... 4
7 Условия выполнения измерений ... 6
8 Подготовка к выполнению измерений ... 6
9 Подготовка проб ... 9
10 Выполнение измерений ... 11
11 Вычисление и оформление результатов анализа ... 13
12 Контроль точности результатов анализа ... 15
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний ... 17
Библиография ... 18

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение антибиотиков методом инверсионной вольтамперометрии (левомицетин, тетрациклин)

Food products
Determination of antibiotics by the method of inversion voltammetry (chloromycetin, tetracycline)

Дата введения –

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продукты пищевые (мясо, субпродукты, яйца, молоко и продукты его переработки) и устанавливает инверсионный вольтамперометрический метод определения массовой концентрации тетрациклина и левомицетина.

Диапазон определяемых концентраций антибиотиков составляет в молоке от 3,0 до 30,0 мкг/кг, в яйце, мясе, субпродуктах убойных животных от 0,006 до 0,100 мг/кг.

Если содержание вещества в пробе выходит за верхнюю границу диапазона содержания определяемых веществ в аттестованных смесях, допускается разбавление (до двух раз) подготовленной к измерению пробы.

П р и м е ч а н и е – Качественное определение(обнаружение) антибиотиков в пищевых продуктах, основанное на подавлении антибиотиком дегидрогеназной активности тест-культур в жидкой питательной среде, проводится по ГОСТ 31903.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

ГОСТ ISO 5725–2003 (части 1-6) Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений

ГОСТ 8.315–97 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019–79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

Издание официальное

ГОСТ 12.4.009–83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 427–75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;

ГОСТ 2156–76 Натрий двууглекислый. Технические условия;

ГОСТ 2405–88 Манометры, вакуумметры, мановакуумметры, напоромеры, тягомеры и тягонапоромеры. Общие технические условия;

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3769–78 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия;

ГОСТ 5381–93 (ISO 5019-1:1984, ISO 5019-2:1984, ISO 5019-5:1984) Изделия высокоогнеупорные хромитопериклазовые. Технические условия;

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия;

ГОСТ 7269–79 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести;

ГОСТ 7702.0–74 Мясо птицы. Методы отбора образцов. Органолептические методы оценки качества;

ГОСТ 9293–74 (ISO 2435:1973) Азот газообразный и жидкий. Технические условия;

ГОСТ 9792–73. Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб;

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия;

ГОСТ 14261–77 Кислота соляная особой чистоты. Технические условия;

ГОСТ 15150–69 Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды;

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия;

ГОСТ 21400–75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний;

ГОСТ 22280–76. Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия;

ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные. Общие технические требования;

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;

ГОСТ 26809–86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу;

ГОСТ 27583–88. Яйца куриные пищевые. Технические условия;

ГОСТ 29225–91 (ISO 1775:1975) Посуда и оборудование фарфоровые лабораторные. Общие требования и методы испытаний;

ГОСТ 29227–91 (ISO 835:2007) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования;

ГОСТ 31903–2012 Продукты пищевые. Экспресс-метод определения антибиотиков.

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим

информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Отбор проб

3.1 Отбор и подготовку лабораторной пробы к испытаниям проводят в соответствии с нормативным документом на испытуемый вид продукции: молоко и молочные продукты – по ГОСТ 26809; мясо и мясные продукты – по ГОСТ 7269; мясо птицы – по ГОСТ 7702.0.

3.2 Из объединенной лабораторной пробы для испытания отбирают две параллельные навески.

3.3 Пробы анализируют в течение рабочего дня, так как антибиотики со временем разлагаются (происходит уменьшение их концентрации).

3.4 Пробы хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 5 °С в сосудах из химического стекла под темным колпаком.

4 Метод определения

4.1 Сущность метода

Сущность метода состоит в переводе левомицетина и тетрациклина из пробы в раствор, кислотном гидролизе и осаждении белка из гидролизата с последующим дифференциально-вольтамперометрическим (ВА) определением антибиотиков: левомицетина, тетрациклина.

Метод измерения основан на способности левомицетина восстанавливаться на индикаторном ртутно-пленочном электроде в фоновом электролите – 0,10 моль/дм^3 растворе сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$ в области потенциалов от минус 0,45 до минус 0,95 В, тетрациклина – окисляться на индикаторном стеклоуглеродном электроде в фоновом электролите – 0,1 моль/дм^3 растворе цитрата натрия в области потенциалов от 0,65 до 0,85 В. Содержание антибиотиков определяют по высоте пика, регистрируемого при потенциале левомицетина – (минус 0,65±0,05) В, при потенциале тетрациклина – (0,75±0,05) В относительно хлорсеребряного электрода в дифференциальном режиме съемки вольтамперограмм. Массовую концентрацию антибиотиков в пробе определяют методом добавок аттестованных смесей левомицетина и тетрациклина. В качестве стандартных калибровочных образцов используют серийные лекарственные вещества левомицетин и тетрациклина гидрохлорид, соответствующие требованиям [1], [2].

5 Требования к выполнению аналитических измерений

5.1 Условия безопасного проведения работ

5.1.1 При выполнении аналитических измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

5.1.2 Электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТ 12 1.019.

5.1.3 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009

5.1.4 Металлическую ртуть (не более 1,0 $см^3$) хранят под слоем воды в бюксе, помещенном в толстостенную склянку.

5.1.5 Необходимо иметь средства сбора и нейтрализации ртути (амальгамированную медную пластинку, раствор хлорного железа).

5.2 Требования к квалификации операторов

Выполнение измерений производятся лаборантом или химиком-аналитиком, владеющим техникой вольтамперометрического анализа и изучившим инструкцию по эксплуатации используемой аппаратуры.

6 Аппаратура, материалы и реактивы

При проведении количественного химического анализа применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, посуду, материалы и реактивы.

6.1 Средства измерений и вспомогательное оборудование

Серийный полярограф с дифференциальным режимом записи вольтамперограмм (ПУ-1 или другой) в комплекте с двухкоординатным самописцем и цифровым вольтметром типа Ф-203;

или анализатор вольтамперометрический СТА по действующим нормативным документам в комплекте с IBM-совместимым компьютером;

или анализатор вольтамперометрический ТА-2 по действующим нормативным документам в комплекте с IBM-совместимым компьютером.

Допускается использовать другое оборудование и приборы, позволяющие воспроизводить метрологические характеристики, указанные в данном стандарте.

Электрохимическая ячейка или электрохимический датчик, в состав которого входят:

электроды:

– индикаторный ртутно-пленочный электрод (РЭП) с рабочей поверхностью от 15 до 20 $мм^2$;

– индикаторный стеклоуглеродный электрод (СУЭ) с рабочей поверхностью от 80 до 120 $мм^2$;

– сравнения хлорсеребряный электрод (ХСЭ) с сопротивлением не более 3,0 кОм;

сменные стаканчики из кварцевого стекла вместимостью от 15,0 до 25,0 $см^3$;

трубка для подвода инертного газа с целью удаления растворенного кислорода и перемешивания раствора;

Редуктор по ГОСТ 5381 с манометром (250±1) атмосфер по ГОСТ 2405;

Весы лабораторные аналитические общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, второго класса точности по ГОСТ 24104;

Дозаторы пипеточные емкостью от 0,01 до 1,00 $см^3$ или от 10 до 1000 мкл типа П1 или другого типа;

Аппарат для бидистилляции воды (стеклянный) АСД-4 по ГОСТ 15150;

Баня водяная;

Шланги полиэтиленовые для подвода газа к ячейке;

Линейка измерительная по ГОСТ 427;

Холодильник электрический;

Центрифуга лабораторная марки ОПН-8.

6.2 Посуда

Посуда и оборудование фарфоровые лабораторные – по ГОСТ 29225.

Посуда лабораторная стеклянная.

Пипетки градуированные – по ГОСТ 29227.

Пипетки мерные лабораторные стеклянные второго класса точности вместимостью 0,50; 1,00; 2,00; 5,00, 10,0 $см^3$ – по ГОСТ 29227.

Посуда и оборудование лабораторные стеклянные – по ГОСТ 25336 или посуда мерная лабораторная стеклянная второго класса точности – по ГОСТ 1770.

Колбы мерные вместимостью 25,0; 50,0, 100,0; 1000 $см^3$.

Цилиндры вместимостью 10,0;25,0 $см^3$.

Пробирки мерные вместимостью 10,0; 15,0 $см^3$.

Кварцевые стаканчики вместимостью от 15,0 до 25,0 $см^3$.

Пробирки для центрифугирования из стекла или пластмассовые вместимостью от 10,0 до 20,0 $см^3$.

Колбы конические – по ГОСТ 25336, вместимостью 100,0 $см^3$ и 250,0 $см^3$.

6.3 Реактивы и материалы

Левомицетин (сухой порошок с содержанием основного вещества не менее 98,5 %), соответствующий [2].

Тетрациклина гидрохлорид (сухой порошок с содержанием основного вещества не менее 98,5 %), соответствующий [3].

Спирт этиловый высшей очистки – по ГОСТ 18300.

Кислота соляная концентрированная – по ГОСТ 14261 осч или по ГОСТ 3118.

Калия хлорид – по действующим нормативным документам.

Аммония сульфат – по ГОСТ 3769.

Натрия цитрат – по ГОСТ 22280.

Азот газообразный – по ГОСТ 9293 или другой инертный газ (аргон, гелий) с содержанием кислорода не более 0,03 %.

Вода бидистиллированная по действующим нормативным документам или дистиллированная – по ГОСТ 6709, перегнанная в присутствии серной кислоты

(0,5 $см^3$ концентрированной серной кислоты на 1,0 $дм^3$ дистиллированной воды и 3,0 $см^3$ раствора перманганата натрия, массовая доля 3 %).

Бумага индикаторная универсальная (pH от 1 до 14).

Бумага фильтровальная – по ГОСТ 12026 или фильтры обеззоленные (зеленая или синяя лента).

Бумага масштабно-координатная.

Все реактивы должны быть квалификации о.с.ч. (особой чистоты) или х.ч. (химически чистые).

7 Условия выполнения измерений

При выполнении анализов должны соблюдаться следующие условия:

– температура окружающего воздуха (25±10) ^{0}С;

– атмосферное давление (760±60) мм рт. ст. или (97±10) кПа;

– относительная влажность (65±15) %;

– частота переменного тока (50±5) Гц;

– напряжение сети (220±10) В.

Конкретные условия регистрации аналитических сигналов определяемого вещества приведены в разделах 9, 10 настоящего стандарта.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Подготовка приборов к работе

Подготовку и проверку полярографа (ПУ-1 или другого), вольтамперометра, самописца, цифрового вольтметра производят в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

8.1.1 Устанавливают следующий режим работы серийного полярографа ПУ-1 в режиме дифференцирования, в соответствии с таблицей 1:

– двухэлектродная система измерений;

– постояннотоковый режим регистрации вольтамперограмм с последующим дифференцированием;

– катодная развертка потенциала.

Т а б л и ц а 1 – Рекомендуемый режим работы полярографа ПУ-1

Параметры	Тетрациклин	Левомицетин
Поляризующее напряжение для электронакопления антибиотиков, В	- 0,05	- 0,45
Потенциал начала регистрации вольтамперной кривой, В	+ 0,20	- 0,45
Конечное напряжение развертки, В	+ 1,00	- 0,95
Потенциал очистки (дорастворение) электрода, В	- 0,20	- 0,95
Время очистки, с	от 10 до 15	от 10 до 15
Скорость линейного изменения потенциала, мВ/с	10	от 10 до 25
Чувствительность прибора при регистрации вольтамперограммы (в зависимости от содержания вещества в анализируемой пробе и поверхности электрода), А/мм	от $1 \cdot 10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-10}$	от $1 \cdot 10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-10}$
Время электролиза, с	от 20 до 30	30

8.2 Подготовка лабораторной посуды

Новую лабораторную стеклянную посуду, сменные наконечники дозаторов, пипетки промывают многократно бидистиллированной водой и высушивают. Сменные кварцевые стаканчики хранят, закрыв калькой, в сухом виде.

Проверку стаканчиков для анализа на чистоту проводят путем регистрации вольтамперограмм фонового электролита согласно 10.1 после многократного ополаскивания их бидистиллированной водой и фоновым электролитом.

Посуда считается чистой, если аналитические сигналы органического соединения в фоновом электролите равны или близки к нулю (не более 2 мм, при чувствительности прибора $5 \cdot 10^{-10}$ А/мм).

8.3 Приготовление и проверка работы электродов

Подготовка индикаторного ртутно-пленочного электрода

Индикаторный ртутно-пленочный электрод представляет собой фторопластовый стержень с запрессованной серебряной проволокой диаметром 2,0 мм длиной от 9 до 10 мм, площадь поверхности составляет от 15,0 до 20,0 $мм^2$ (поставляется потребителю в готовом виде).

Для подготовки электрода к работе необходимо нанести на поверхность серебра пленку ртути толщиной от 8 до 10 мкм. Покрытие ртутью производят путем опускания рабочей части электрода (серебряной проволоки) в металлическую ртуть на время от 2 до 3 с, затем ртуть растирают фильтровальной бумагой для равномерного распределения по поверхности серебра. В том случае, если на конце серебряной проволоки «свисает» избыточное количество ртути в виде капли, ее необходимо удалить стряхиванием в бюкс с ртутью.

Электрод промывают бидистиллированной водой. Процедуру амальгамирования рабочей поверхности электрода повторяют при появлении незаамальгамированных участков на поверхности электрода. При образовании серого налета на поверхности, электрод протирают фильтровальной бумагой.

Индикаторные СУЭ поставляется потребителю в готовом виде. Перед регистрацией каждой вольтамперограммы следует проводить промывку индикаторного СУЭ бидистилированной водой, кратковременно погружать рабочую часть электрода на время от 2 до 3 с в этанол и полировать его поверхность с помощью фильтровальной бумаги.

После проведения анализа СУЭ хранить в сухом виде.

Подготовка к работе электрода сравнения

В качестве электрода сравнения используют хлорсеребряный электрод. Новый хлорсеребряный электрод сравнения заполняют насыщенным раствором хлорида калия, закрывают пробкой отверстие и выдерживают не менее 24 часов для установления равновесного значения потенциала. После проведения анализов электрод хранят, погрузив в насыщенный раствор хлорида калия.

Проверку работы индикаторного ртутно-пленочного электрода, СЭУ и электрода сравнения проводят в соответствии с 10.1.

8.4 Приготовление растворов

8.4.1 Приготовление фонового электролита

Раствором фонового электролита для левомицетина служит раствор 0,10 моль/дм^3 сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$. Для приготовления раствора на аналитических весах взвешивают навеску 13,20 г с точностью до 0,01 г сульфата аммония и помещают в мерную колбу вместимостью 1000,0 см^3, растворяют вещество в небольшом количестве бидистиллированной воды и доводят бидистиллированной водой до метки.

Раствором фонового электролита для тетрациклина служит раствор 0,10 моль/дм^3 цитрата натрия.

8.4.2 Приготовление основного раствора левомицетина

Основным раствором (ОР) является рабочий стандартный раствор левомицетина (рабочий стандартный образец) 1000,0 мг/дм^3, приготовленный из сухого порошка левомицетина, удовлетворяющего требованиям [2], [3].

Основной раствор, содержащий 1000,0 мг/дм^3 левомицетина, готовят следующим образом: на аналитических весах взвешивают навеску (0,1000±0,0001) г левомицетина, переносят в мерную колбу вместимостью 100,0 см^3 и доводят до метки этиловым спиртом.

Основной раствор левомицетина концентрации 1000,0 мг/дм^3 устойчив в течение трех месяцев при температуре от 2 °С до 5 °С.

8.4.3 Приготовление основного раствора тетрациклина

Основным раствором (ОР) является рабочий стандартный раствор тетрациклина (рабочий стандартный образец) 1000,0 мг/дм^3, приготовленный из сухого порошка тетрациклина, удовлетворяющего требованиям [2], [3].

Основной раствор, содержащий 1000,0 мг/дм^3 тетрациклина, готовят следующим образом: на аналитических весах взвешивают навеску (0,1000±0,0001) г тетрациклина, переносят в мерную колбу вместимостью 100,0 см^3 и доводят до метки этиловым спиртом.

Основной раствор тетрациклина концентрации 1000,0 мг/дм^3 устойчив в течение трех месяцев при температуре от 2 °С до 5 °С.

Аттестованные смеси серий АС-1, АС-2, АС-3 АС-4, АС-5 с содержанием антибиотиков 100,0; 10,0; 5,0; 2,0 и 0,5 мг/дм^3 готовят соответствующим разбавлением исходных растворов в мерных колбах или мерных пробирках этиловым спиртом, согласно Таблице 2.

Исходным раствором для приготовления АС-1 является основной раствор соответствующего антибиотика, для приготовления АС-2 исходным раствором является АС-1, для приготовления АС-3 исходным раствором является АС-2, для приготовления АС-4 исходным раствором является АС-3 и для АС-5 исходным раствором является АС-4 .

Т а б л и ц а 2 – Приготовление аттестованных смесей

Концентрация исходного раствора для приготовления АС, мг/дм^3	Отбираемый объем, см^3	Объем мерной посуды, см^3	Концентрация приготовленного раствора АС, мг/дм^3	Код полученного (АС) раствора антибиотика
1000,0	2,50	25,0	100,0	АС-1
100,0	2,50	25,0	10,0	АС-2
10,0	12,50	25,0	5,0	АС-3
10,0	5,00	25,0	2,0	АС-4
2,0	2,50	10,0	0,5	АС-5

АС-1 устойчива в течение 30 дней при хранении под темным колпаком в холодильнике при температуре от 2 °С до 5 °С;

АС-2 устойчива в течение 7 дней при хранении под темным колпаком в холодильнике при температуре от 2 °С до 5 °С;

АС-3, АС-4 и АС-5 устойчивы в течение одного дня.

При наличии государственного стандартного образца (ГСО) раствора определяемого вещества основные растворы готовят из соответствующего государственного стандартного образца (ГСО) в соответствии с инструкцией по приготовлению раствора.

8.4.4 Приготовление раствора хлорида калия концентрации 1,0 моль/дм^3

Навеску (7,46±0,01) г хлорида калия помещают в мерную колбу вместимостью 100,0 см^3, растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

8.4.5 Приготовление раствора соляной кислоты

Раствор соляной кислоты концентрации 6,0 моль/дм^3.

Соляную кислоту (квалификации х.ч.) перегоняют. Перегнанная при температуре 20 °С соляная кислота должна быть концентрации не менее 6,0 моль/дм^3.

Раствор соляной кислоты концентрации 0,10 моль/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят небольшой объем (100 см^3) бидистиллированной воды, затем перегнанную соляную кислоту объемом 16,7 см^3 с концентрацией 6,0 моль/дм^3, перемешивают и доводят до метки бидистиллированной водой.

9 Подготовка проб

9.1 Подготовка молока или молочного продукта (для определения левомицетина)

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 вносят 25,00 г молока или молочного продукта, взвешенного с точностью до 0,01 г, добавляют 1,0 см^3 соляной кислоты концентрации от 6 до 7 моль/дм^3 порциями по 0,2 см^3. Смесь слегка перемешивают и оставляют на 15 минут, после чего разливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 15 минут при скорости 6000 об/мин.

Центрифугат сливают в коническую колбу, помещают на водяную баню с температурой (35±5) °С и добавляют от 5 до 6 г сульфата аммония порциями от 2 до

3 г, каждый раз перемешивая содержимое колбы стеклянной палочкой до растворения соли.

Колбу с пробой выдерживают на водяной бане при указанной температуре в течение 20 минут, затем на 10 минут помещают в морозильную камеру холодильника.

После охлаждения содержимое колбы разливают в центрифужные пробирки, центрифугируют 15 минут при скорости 6000 об/мин. Центрифугат фильтруют в чистый стаканчик вместимостью 30 $см^3$ через двойной слой бумажного фильтра (синяя лента).

Полученный фильтрат является подготовленной пробой.

Для анализа берут аликвоту подготовленной пробы объемом 5,0 $см^3$.

9.2 Подготовка проб молока или молочных продуктов (для определения тетрациклина)

В коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ вносят 25 г молока или молочного продукта, взвешенного с точностью до 0,01 г, добавляют 15,0 $см^3$ бидистиллированной воды и 0,5 $см^3$ концентрированной соляной кислоты. Смесь энергично встряхивают в течение 5 минут. Затем к смеси добавляют 1,5–2,0 г сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$ и 1,0 $см^3$ раствора ацетата цинка концентрацией 300,0 $г/дм^3$, к полученной смеси прибавляют несколькими порциями от 0,5 до 1,0 г гидрокарбоната натрия до pH 6,0–6,5, контролируя pH раствора по индикаторной бумаге.

Смесь встряхивают в течение 5 минут (до прекращения интенсивного газовыделения). Полученную смесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 минут при скорости 8000 об/мин.

Затем центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 1,0–1,1 г цитрата натрия и перемешивают до полного растворения.

Для анализа берут аликвоту полученного фильтрата подготовленной пробы объемом 10,0 $см^3$.

9.3 Подготовка проб мяса и субпродуктов

В коническую колбу вместимостью 250 $см^3$ вносят навеску пробы гомогенизированного мяса или субпродуктов от 5,00 до 10,00 г, взятую с точностью до 0,01 г. Добавляют 5,0 $см^3$ этилового спирта и 20,0 $см^3$ раствора соляной кислоты концентрации 0,10 $моль/дм^3$. Смесь встряхивают от 10 до 15 минут, переносят в пробирки для центрифугирования и центрифугируют в течение 15 минут при скорости вращения 6000 об/мин.

Затем центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$. В колбу с фильтратом добавляют от 3,0 до 5,0 г сульфата аммония. Содержимое колбы встряхивают от 5 до 10 минут.

Полученную смесь переносят в пробирки для центрифугирования и центрифугируют в течение 15 минут при скорости вращения 6000 об/мин. Затем центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$.

Для анализа берут аликвоту полученного фильтрата подготовленной пробы объемом от 1,0 до 5,0 $см^3$ (в зависимости от содержания левомицетина в продукте).

9.4 Подготовка проб яиц

Содержимое из разбитого яйца помещают в любую посуду (стакан, чашку и т.п.), тщательно перемешивают и взбивают яйцо до однородной массы. В коническую колбу вместимостью 250 $см^3$ вносят навеску пробы гомогенизированного яйца от 5,0 до 10,0 г, взятую с точностью до 0,01 г.

Добавляют 5,0 $см^3$ этилового спирта и 20,0 $см^3$ раствора соляной кислоты концентрации 0,10 моль/$дм^3$. Смесь встряхивают в течение от 10 до 15 минут, переносят в пробирки для центрифугирования и центрифугируют в течение 15 минут при скорости вращения 6000 об/мин.

Затем центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$. В колбу с фильтратом добавляют от 3,0 до 5,0 г сульфата аммония. Содержимое колбы встряхивают от 5 до 10 минут.

Полученную смесь переносят в пробирки для центрифугирования и центрифугируют в течение 15 минут при скорости вращения 6000 об/мин. Затем центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$.

Для анализа берут аликвоту полученного фильтрата подготовленной пробы объемом от 1,0 до 5,0 $см^3$ (в зависимости от содержания левомицетина в продукте).

10 Выполнение измерений

При проведении анализов проб мяса, молока, яиц и продуктов их переработки для определения массовой концентрации антибиотиков методом ВА необходимо выполнять следующие операции на серийных полярографах (ПУ-1 и др.).

10.1 Проверка стаканчиков, фонового раствора и электрода на чистоту

10.1.1 В приготовленный согласно 8.2 кварцевый стаканчик вместимостью от 15,0 до 25,0 $см^3$ с помощью пипетки вносят 10,0 $см^3$ фонового электролита. Стаканчик с полученным фоновым электролитом помещают в электрохимическую ячейку.

10.1.2 Опускают в раствор индикаторный электрод и электрод сравнения и подключают их к соответствующим клеммам прибора, устанавливают соответствующий потенциал от минус 0,45 до 0,05 В.

10.1.3 Устанавливают чувствительность прибора от $1 \cdot 10^{-9}$ до $5 \cdot 10^{-10}$ А/мм и включают режим дифференцирования.

10.1.4 Включают газ и проводят процесс электронакопления при потенциале минус 0,45 В или потенциале минус 0,05 В в течение 30 секунд при перемешивании раствора.

10.1.5 По окончании электролиза отключают газ и через 5 секунд начинают регистрацию вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от минус 0,45 до минус 0,95 В или в диапазоне от плюс 0,20 до плюс 1,00 В. Потенциал катодного пика левомицетина находится в диапазоне (минус 0,65±0,05) В, тетрациклина – в диапазоне (0,75±0,05) В.

10.1.6 Останавливают потенциал при минус 0,95 В и проводят дорастворение примесей с поверхности электрода при перемешивании раствора в течение 10–15 секунд (для левомицетина).

10.1.7 Устанавливают потенциал 0,20 В и проводят дорастворение примесей с поверхности электрода при перемешивании раствора в течение 10–15 с (для тетрациклина).

10.1.8 Операции согласно 10.1.4–10 1.6 повторяют 2-3 раза.

При наличии на вольтамперограмме сигнала органического вещества менее 2 мм стаканчик, фоновый электролит и индикаторный электрод считают готовыми к проведению анализа. В противном случае проводят очистку электрода или стаканчика и повторяют операции в соответствии с 10.1.1–10.1.8.

10.1.10 Отключают электроды от прибора, вынимают стаканчик с раствором из ячейки или датчика и выливают содержимое стаканчика в сосуд для слива.

10.2 Анализ пробы

10.2.1 При определении левомицетина в стаканчик, подготовленный к проведению измерений в соответствии с 10.1, помещают 5 $см^3$ фонового электролита и аликвоту подготовленной пробы объемом 5 $см^3$.

При определении тетрациклина в стаканчик, подготовленный к проведению измерений в соответствии с 10.1, помещают 10 $см^3$ анализируемой пробы, подготовленной к измерению по 9.2.

10.2.2 Помещают стаканчик с анализируемым раствором в электрохимическую ячейку или датчик.

10.2.3 Повторяют последовательно операции согласно 10.1.2–10.1.6.

10.2.4 Если высота катодного пика антибиотиков превышает 200 мм, то необходимо уменьшить чувствительность прибора. Если высота катодного пика вещества меньше 5 мм, то необходимо увеличить чувствительность прибора.

10.2.5 Операции согласно 10.1.4–10.1.6 повторяют три раза.

10.2.6 Измеряют высоты катодных пиков (левомицетин), анодных пиков (тетрациклин) определяемого вещества.

10.2.7 В стаканчик с анализируемым раствором с помощью пипетки или дозатора вносят добавку аттестованной смеси антибиотиков в таком объеме, чтобы высота пика на вольтамперной кривой увеличилась в два раза по сравнению с первоначальной. Добавку вносят в малом объеме, чтобы предотвратить изменение концентрации фонового раствора.

Рекомендуемые добавки аттестованных смесей известной концентрации и чувствительность прибора приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Рекомендуемые добавки аттестованных смесей

Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг	Время электролиза, с	Концентрация АС для добавок, $мг/дм^3$	Рекомендуемый объем добавки АС, $см^3$	Чувствительность прибора, А/мм
От 0,006 до 0,05	30	0,5	От 0,02 до 0,20	$5 \cdot 10^{-10}$
От 0,5 до 0,100	30	10	От 0,02 до 0,05	$1 \cdot 10^{-9}$
От 3,0 до 15,0	30	0,5 или 2,0	От 0,03 до 0,04	$5 \cdot 10^{-10}$
От 10,0 до 30,0	30	2,0 или 5,0	От 0,02 до 0,03	$1 \cdot 10^{-9}$

10.2.8 Проводят электронакопление и регистрацию вольтамперограмм по 10.1.4–10.1.6 три раза.

10.2.9 Измеряют высоты катодных (анодных) пиков антибиотиков в пробе с добавкой АС.

10.2.10 Выливают содержимое стаканчика в сосуд для слива.

10.2.11 Стаканчик промывают бидистиллированной водой, затем протирают влажным фильтром, добавив небольшое количество питьевой соды, промывают бидистиллированной водой и фоновым электролитом.

10.2.12 Операции согласно 10.2.1–10.2.11 проводят для каждой из параллельных анализируемых проб в одинаковых условиях.

10.2.13 При выполнении измерений по настоящему стандарту рекомендуется ведение записей условий анализа в рабочем журнале и регистрация вольтамперограммы на ленте самописца с указанием пробы и условий анализа согласно таблице 4.

Таблица 4 – Рекомендуемая форма записи результатов измерений при анализе проб

Определяемое вещество	Анализируемая проба (характеристика, номер, дата)	Условия измерений (чувствительность; время электролиза; объем аликвоты)	Высота пика вещества в пробе, мм, или ток, А	Добавка АС: $V_д$, $см^3$; $C_д$, $мг/дм^3$	Высота пика вещества после добавки АС, мм, или ток, А

11 Вычисление и оформление результатов анализа

Обработку результатов измерений аналитических сигналов – высот катодных пиков, анодных пиков – определяемого вещества и расчет массовых концентраций антибиотиков в пробах проводят следующим образом.

11.1 Расчет величин максимальных катодных (анодных) токов

11.1.1 Для определяемого компонента рассчитывают среднее из трех значений высот пиков, полученных при трехкратной регистрации вольтамперограммы пробы, не учитывая первую вольтамперограмму.

По средней высоте катодного пика или анодного пика для данного вещества вычисляют значение катодного или анодного тока вещества по формуле

$$I_i = h_i \alpha, \quad (1)$$

где I_i – величина максимального катодного или анодного тока данного вещества в данной пробе, А;

h_i – средняя высота пика вещества в пробе, мм;

α – чувствительность прибора при регистрации данного пика, А/мм.

Такой расчет проводят для вольтамперных кривых при регистрации анализируемой пробы (i=1) и пробы с добавкой (i=2) аттестованной смеси вещества.

11.1.3 Если регистрация вольтамперограмм пробы и пробы с добавками проводится без изменения чувствительности прибора, то операции согласно 11.1.2 можно не проводить, используя в дальнейших расчетах величины высот пиков вместо токов пиков.

11.2 Расчет содержания вещества в пробе

11.2.1 Расчет содержания антибиотиков в анализируемой пробе проводят по формуле

$$X' = \frac{I_i C_Д V_Д V_ф 1000}{(I_2 - I_1) m V_{ал}}, \quad (2)$$

где X' – содержание антибиотика в анализируемой пробе, мкг/кг;

$C_Д$ – концентрация аттестованной смеси (АС) антибиотика, из которой делается добавка к анализируемой пробе, мкг/кг;

$V_Д$ – объем добавки АС антибиотика, см^3;

I_1 – величина максимального катодного или анодного тока антибиотика в анализируемой пробе, А;

I_2 – величина максимального катодного или анодного тока в пробе с добавкой АС антибиотика, А;

m – масса анализируемого продукта, г;

$V_ф$ – суммарный объем анализируемой смеси (фильтрата), см^3;

$V_{ал}$ – объем аликвоты пробы, взятой для анализа, см^3.

11.2.2 Аналогичные вычисления проводят согласно 11.1.1–11.2.1 для второй параллельной анализируемой пробы. Получают соответственно значения X''.

11.2.3 Результаты измерений и вычислений рекомендуется оформлять записью в журнале по форме, приведенной в таблице 5.

Т а б л и ц а 5 – Рекомендуемая форма записи результатов анализа проб

Проба (номер, характеристика)	Номер параллельного определения	Содержание вещества в каждой из параллельных проб	Среднее содержание вещества в пробе	Расхождение между параллельными результатам	Норматив контроля сходимости	Вывод по сходимости
1	2	3	4	5	6	7

11.2.4 Таким образом, по двум параллельным определениям получают два значения концентрации X' и X''. Далее рассчитывают среднее арифметическое по формуле

$$X = \frac{X' + X''}{2}. \quad (3)$$

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений с тем же числом значащих цифр.

Если расхождение между результатами параллельных определений не превышает $|X'-X''| \le 0{,}01 d X$, где X'', X' и X – результаты параллельных определений и их среднее арифметическое, а d – норматив контроля сходимости, то среднее арифметическое X принимают за результат анализа. В противном случае анализ повторяют. Значение норматива d приведено в таблице 6.

По полученному результату анализа X и значению относительной погрешности δ, приведенной в таблице 6, рассчитывают абсолютную погрешность $\Delta = 0{,}01 \delta X$.

Результат анализа представляют в виде ($X \pm \Delta$), мг/кг или %, при P=0,95.

12 Контроль точности результатов анализа

Внутренний оперативный контроль (ВОК) качества результатов анализа включает контроль сходимости, воспроизводимости и точности результатов анализа.

12.1 Сходимость параллельных определений контролируют для каждой анализируемой пробы согласно 11.2.4.

12.2 Для проведения контроля воспроизводимости используют рабочие пробы. Пробу делят на две равные части и анализируют в соответствии с настоящим стандартом в разных лабораториях или в одной лаборатории, максимально варьируя условия проведения анализа, то есть, используют разные наборы мерной посуды, анализы выполняют в разные дни или два различных аналитика.

Воспроизводимость контрольных анализов признают удовлетворительной, если $|X'-X''| \le 0{,}01 D_{отн} X$, где X'', X' и X – результаты анализа одной и той же пробы, полученные в разных лабораториях или при варьирующих условиях в одной лаборатории и их среднее арифметическое значение, $D_{отн}$ – значение норматива внутреннего оперативного контроля воспроизводимости. Значение норматива $D_{отн}$ приведено в таблице 6.

Периодичность проведения контроля воспроизводимости – не реже одного раза в две недели.

Таблица 6 – Диапазон измерений, значение характеристики относительной погрешности и нормативы оперативного контроля случайной составляющей относительной погрешности (сходимости и воспроизводимости) при доверительной вероятности P=0,95

Диапазон измерений, мг/кг	Характеристика погрешности (граница интервала, в котором погрешность находится с заданной вероятностью) $\pm \delta$, %	Норматив оперативного контроля сходимости $d_{отн}$, % (для двух результатов параллельных определений, n = 2)	Норматив оперативного контроля воспроизводимости $D_{отн}$, % (для двух результатов измерений, m = 2)
Левомицетин от 3,0 до 30,0 включительно	22	28	41
Тетрациклин от 3,0 до 30,0 включительно	24	30	42

12.3 Для проведения контроля точности используют рабочие пробы с известной добавкой антибиотиков. В качестве добавки антибиотиков используют государственные стандартные образцы или аттестованные смеси. Пробу делят на две равные части, первую из которых анализируют в соответствии с настоящим стандартом, а во вторую вводят известную добавку антибиотиков и затем также анализируют в соответствии с настоящим стандартом. Величина добавки должна составлять от 50 % до 150 % от содержания антибиотиков в анализируемой пробе.

Точность контрольных анализов признают удовлетворительной, если $|X_1-X-c|\leq K$, где X_1, X и c – результаты контрольных анализов пробы с добавкой левомицетина (или тетрациклина), реальной пробы и величина добавки левомицетина (или тетрациклина) соответственно; K – норматив оперативного контроля точности.

Норматив оперативного контроля точности рассчитывают по формулам (4) и (5):

при проведении внутрилабораторного контроля (P=0,90):

$$К = 0{,}84\sqrt{\left(\Delta_{X_1}\right)^2 + (\Delta_X)^2}, \quad (4)$$

при проведении внешнего контроля (P=0,95):

$$К = \sqrt{\left(\Delta_{X_1}\right)^2 + (\Delta_X)^2}, \quad (5)$$

где Δ_{X_1} и Δ_X – значения характеристики погрешности, соответствующие массовой концентрации левомицетина (или тетрациклина) в пробе с добавкой стандартных растворов и в реальной пробе соответственно;

$\Delta_{X_1} = 0{,}01\delta X_1 \cdot X_1$ и $\Delta_X = 0{,}01\delta X \cdot X$,

где X_1 и X – массовая концентрация антибиотиков в пробе с добавкой и в реальной пробе, мг/кг или %, соответственно.

Значения относительной погрешности δ приведены в таблице 6.

Контроль точности анализа проводят не реже одного раза в месяц, а также при смене реактивов или после длительного перерыва в работе.

При превышении нормативов оперативного внутреннего контроля точности проводят повторные анализы. При повторном превышении указанных нормативов анализы приостанавливают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Результаты ВОК заносят в специальный журнал.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Межлабораторные испытания выполнены в трех испытательных лабораториях, каждая из которых выполнила определение содержания антибиотиков с пятикратным повторением. Статистические результаты определены в соответствии с ГОСТ ISO 5725 и приведены в таблице А.1.

Т а б л и ц а А.1 – Статистические результаты оценки межлабораторных сличительных испытаний по определению антибиотиков в мясе

Массовая концентрация антибиотиков, мг/дм^3	Число лабораторий (p)	Количество итераций	Общее среднее значение испытываемой характеристики (m)	Среднее квадратическое отклонение сходимости (S_r)	Сходимость, S_r, %	Среднее квадратическое отклонение воспроизводимости (S_R)	Воспроизводимость, S_R, %
От 3 до 5 включ.	3	5	3,6	0,83	23	1,2	33,3
От 5 до 10 включ	3	5	6,4	1,32	21	1,9	30,0
Св. 10 до 30 включ.	3	5	22,1	5,1	23	5,6	25,3

Библиография

[1] ВФС 42991-2003 Фармакопейная статья
[2] ВФС 609-2002 Фармакопейная статья

УДК 663/.664:543.06:006.354 МКС 67.120.01

Ключевые слова: продукты пищевые, вольтамперометрическое определение, антибиотики, левомицетин, тетрациклин, метод отбора и хранения проб, приготовление реактивов, проведение анализа, вычисление результатов.

gost.e-ecolog.ru