МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34820— 2021

МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ

Метод определения остаточных количеств антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность» (МТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 24 декабря 2021 г. № 146-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	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 февраля 2022 г. № 88-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34820—2021 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 15 июня 2022 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных 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 будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022

В Российской Федерации 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

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

МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ

Метод определения остаточных количеств антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Natural honey. Method of determination of residual amounts of antibacterial, antiparasitic, antifungal drugs using high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detector

Дата введения — 2022—06—15

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на натуральный мед и устанавливает метод определения остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (далее — ВЭЖХ-МС/МС).

Диапазон измерений для клотримазола — от 0,1 до 10,0 мкг/кг, для рифампицина, колхицина, имидоклаприда, клотианидина, дапсона — от 1,0 до 100,0 мкг/кг, нистатина, фумагиллина — от 5,0 до 500,0 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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

ГОСТ 12.2.007.0 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.2.085 Арматура трубопроводная. Клапаны предохранительные. Выбор и расчет пропускной способности

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 5848 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 19792—2017 Мед натуральный. Технические условия

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ ИСО 5725-6* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Метод основан на экстракции водой остаточных количеств антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов из анализируемой пробы меда с последующей очисткой методом твердофазной экстракции и количественным определением их методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Идентификацию и количественное определение искомых соединений проводят по площадям пиков ион-продуктов аналитов и соответствующих им внутренних стандартов с помощью градуировочной характеристики, полученной при анализе матричных градуировочных растворов, с помощью ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

4 Условия выполнения измерений и требования безопасности

4.1 При определении остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов в меде должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . от 15 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . от 20 % до 80 %.

4.2 Применяемые в работе реактивы относятся к веществам 1-го и 2-го классов опасности, при работе с ними необходимо соблюдать общие требования безопасности обращения с вредными веществами, установленные ГОСТ 12.1.007. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

4.3 Помещения, в которых проводят анализ и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией и защищены от действия прямого солнечного или ультрафиолетового излучения.

4.4 Приготовление и использование градуировочных растворов проводят в вытяжном шкафу при включенной вентиляции.

4.5 При работе с электроприборами следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.2.007.0, правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением по ГОСТ 12.2.085 и инструкции по эксплуатации прибора.

4.6 К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих высшее образование, прошедших соответствующий инструктаж, владеющих техникой хромато-масс-спектрометрии и требованиями эксплуатации используемых приборов.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

5.1 Для определения остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности взвешивания не более ± 0,03 г;
- весы специального (I) класса точности с пределами допускаемой погрешности взвешивания не более ±0,3 мг;
- масс-спектрометр с квадрупольным анализатором с диапазоном измерений от 50 до 900 атомных единиц массы (а. е. м.), массовым разрешением не менее 1,0 а. е. м., пределами допускаемой

абсолютной погрешности не более ±0,5 а. е. м., с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим MC/MC);

- систему высокоэффективной жидкостной хроматографии, оснащенную бинарным насосом со смесителем, термостатом хроматографической колонки, обеспечивающим температуру нагрева до (50 ± 1) °С;
- колонку хроматографическую длиной не более 150 мм, заполненную обращенно-фазовым сорбентом С18 с диаметром частиц не более 5,0 мкм;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;
- дозаторы механические одноканальные переменной вместимости 1—10, 10—100, 100—1000 мм^3, 1—5 см^3 по ГОСТ 28311;
- пробы меда, не содержащие клотримазол, рифампицин, колхицин, имидоклаприд, клотианидин, дапсон, нистатин, фумагиллин, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, («чистые» пробы*);
- картриджи для твердофазной экстракции** с массой полимерного сорбента 60 мг, вместимостью 3 см^3 и размером частиц сорбента 33 мкм;
- встряхиватель (шейкер) для пробирок;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 4000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 и 50 см^3;
- микроцентрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 15000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптером для пробирок вместимостью 1,5 см^3;
- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 кГц и объемом не менее 1 дм^3;
- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением 18 МОм · см при температуре 20 °С;
- холодильник бытовой с рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С;
- камеру лабораторную морозильную с рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С;
- регистратор (логгер) температуры и влажности;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 и 50 см^3 с навинчиваемыми пластмассовыми крышками;
- виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 см^3 с навинчиваемыми крышками и тефлоновыми прокладками диаметром 9 мм;
- пробирки полипропиленовые микроцентрифужные вместимостью 1,5 см^3;
- фильтры нейлоновые мембранные с размером диаметра пор не более 0,2 мкм;
- колбы 2-10-2 по ГОСТ 1770;
- пробирки мерные П-2-15-14/23 ХС по ГОСТ 1770;
- цилиндры 1-10 (50, 1000)-2 по ГОСТ 1770;
- бутыли стеклянные с горловиной под крышку с винтовой резьбой вместимостью 1000 см^3.

5.2 При определении остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов применяют следующие реактивы:

- ацетонитрил для ВЭЖХ (HPLC);
- кислоту муравьиную по ГОСТ 5848, ч. д. а.;
- воду деионизированную для ВЭЖХ;
- метанол-яд по ГОСТ 6995, х. ч.

5.3 При определении остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов применяют:

5.3.1 Стандартные образцы с массовой долей основного вещества не менее 85 %:

- клотримазол, CAS 23593-75-1;
- фумагиллин, CAS 23110-15-8;

---

* Срок хранения «чистых» проб при температуре от минус 15 °С до минус 25 ºС — не более 6 мес.

** Например, с полимерным сорбентом Strata-X, Phenomenex. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других сорбентов с аналогичными характеристиками.

- колхицин, CAS 64-86-8;
- рифампицин, CAS 13292-46-1;
- нистатин, CAS 1400-61-9;
- имидаклоприд, CAS 138261-41-3;
- клотианидин, CAS 210880-92-5;
- дапсон, CAS 80-08-0.

5.3.2 Внутренние стандарты с массовой долей основного вещества не менее 85 %:

- клотримазол-Д5, CAS 1185076-41-8;
- рифампицин-Д3, CAS 1262052-36-7;
- колхицин-Д3, CAS 1314417-96-3;
- рокситромицин-Д7, CAS 80214-83-1;
- сульфапиридин, CAS 144-83-2.

5.4 Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, материалов, посуды и реактивов, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также вспомогательного оборудования, реактивов и материалов, по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Приготовление подвижных фаз А и Б

6.1.1.1 Для приготовления подвижной фазы А в мерный цилиндр вместимостью 1000 см^3 вносят 995 см^3 метанола и 5 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают и переливают в стеклянную бутыль.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С — не более 1 мес.

6.1.1.2 Для приготовления подвижной фазы Б в мерный цилиндр вместимостью 1000 см^3 вносят 995 см^3 деионизированной воды и 5 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают и переливают в стеклянную бутыль.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С — не более 1 мес.

6.1.2 Приготовление смеси метанола и деионизированной воды в объемном соотношении 1:4

В мерный цилиндр вместимостью 1000 см^3 вносят 800 см^3 деионизированной воды и 200 см^3 метанола, перемешивают и переливают в стеклянную бутыль.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С — не более 1 мес.

6.2 Приготовление рабочих растворов стандартов аналитов и рабочих растворов внутренних стандартов аналитов

6.2.1 Приготовление исходных растворов C_0 стандартов клотримазола, рифампицина, колхицина, имидоклаприда, клотианидина, дапсона, нистатина, фумагиллина массовыми концентрациями 1 мг/см^3

Для приготовления исходных растворов стандартов C_0 в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см^3 вносят по 4,0—6,0 мг каждого стандартного образца и добавляют метанол, m_0, г, массу которого вычисляют по формуле

$$m_0 = \frac{m \cdot M_a \cdot P_a \cdot p}{M_c \cdot 100 \cdot c}, \quad (1)$$

где m — масса стандартного образца, г;

M_a — молярная масса чистого вещества, г/моль;

P_a — массовая доля основного вещества в стандартном образце, %;

p — плотность метанола, г/см^3;

M_c — молярная масса аналита в солевой форме, г/моль;

c — концентрация раствора C_0, г/см^3.

После чего пробирки помещают в ультразвуковую баню на 5 мин.

Допускается приготовление растворов объемно-весовым методом.

Плотность метанола, г/см^3, определяют в соответствии с таблицей 1, с учетом температуры окружающего воздуха в помещении.

Таблица 1

Температура окружающего воздуха в помещении, °С	Плотность метанола, г/см^3	Температура окружающего воздуха в помещении, °С	Плотность метанола, г/см^3
15,0	0,7961	20,5	0,7909
15,5	0,7956	21,0	0,7905
16,0	0,7952	21,5	0,7900
16,5	0,7947	22,0	0,7895
17,0	0,7942	22,5	0,7891
17,5	0,7938	23,0	0,7886
18,0	0,7933	23,5	0,7881
18,5	0,7928	24,0	0,7877
19,0	0,7924	24,5	0,7872
19,5	0,7919	25,0	0,7867
20,0	0,7914	—	—

Срок хранения растворов C_0 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более одного года.

Перед применением растворы C_0 выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С не менее 30 мин в воздушной среде, при необходимости (наличии осадка) используют перемешивание в ультразвуковой бане.

6.2.2 Приготовление рабочего раствора C_1 клотримазола, рифампицина, колхицина, имидоклаприда, клотианидина, дапсона, нистатина, фумагиллина

Для приготовления рабочего раствора C_1 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят по 0,1 см^3 растворов C_0 рифампицина, колхицина, клотианидина, имидаклоприда, дапсона, 0,01 см^3 раствора C_0 клотримазола, 0,5 см^3 раствора C_0 нистатина и фумагиллина. Доводят объем раствора до 10 см^3 по метке метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе C_1 рифампицина, колхицина, клотианидина, имидаклоприда и дапсона составляет 10 мкг/см^3, клотримазола — 1 мкг/см^3, фумагиллина и нистатина — 50 мкг/см^3.

Срок хранения раствора при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более 6 мес.

6.2.3 Приготовление рабочего раствора C_2 клотримазола, рифампицина, колхицина, имидоклаприда, клотианидина, дапсона, нистатина, фумагиллина

Для приготовления рабочего раствора C_2 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1 см^3 раствора C_1, доводят объем раствора до 10 см^3 по метке метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе C_2 рифампицина, колхицина, клотианидина, имидаклоприда и дапсона составляет 1 мкг/см^3, клотримазола — 0,1 мкг/см^3, фумагиллина и нистатина — 5 мкг/см^3.

Срок хранения раствора при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более 3 мес.

6.2.4 Приготовление рабочего раствора C_3 клотримазола, рифампицина, колхицина, имидоклаприда, клотианидина, дапсона, нистатина, фумагиллина

Для приготовления рабочего раствора C_3 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1 см^3 раствора C_2, доводят объем раствора до 10 см^3 по метке метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе C_3 рифампицина, колхицина, клотианидина, имидаклоприда и дапсона составляет 0,1 мкг/см^3, клотримазола — 0,01 мкг/см^3, фумагиллина и нистатина — 0,5 мкг/см^3.

Срок хранения раствора при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более одной недели.

Перед применением растворы C_1—C_3 выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С в воздушной среде не менее 30 мин.

6.2.5 Приготовление исходных растворов D_0 внутренних стандартов аналитов с массовыми концентрациями 1 мг/см^3

Для приготовления исходных растворов D_0 в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см^3 вносят по 4,0—6,0 мг каждого внутреннего стандарта и добавляют метанол, массу которого вычисляют по формуле (1). После чего пробирки помещают в ультразвуковую баню на 5 мин.

Допускается приготовление растворов внутренних стандартов объемно-весовым методом.

Срок хранения растворов D_0 при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более одного года.

Перед применением растворы D_0 выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С не менее 30 мин, при необходимости (наличии осадка) используют перемешивание в ультразвуковой бане.

6.2.6 Приготовление рабочего раствора D_1 внутренних стандартов аналитов

Для приготовления рабочего раствора D_1 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 переносят по 0,1 см^3 растворов D_0 рифампицина-Д3, колхицина-Д3, рокситромицина-Д3, сульфапиридина, 0,01 см^3 раствора D_0 клотримазола-Д5, доводят объем раствора до 10 см^3 по метке метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация внутренних стандартов рифампицина-Д3, колхицина-Д3, рокситромицина-Д3 и сульфапиридина в растворе D_1 составляет 10 мкг/см^3, клотримазола-Д5 — 1 мкг/см^3.

Срок хранения раствора при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более 6 мес.

6.2.7 Приготовление рабочего раствора D_2 внутренних стандартов аналитов

Для приготовления рабочего раствора D_2 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 переносят 1 см^3 раствора D_1, доводят объем раствора до 10 см^3 по метке метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация внутренних стандартов рифампицина-Д3, колхицина-Д3, рокситромицина-Д3 и сульфапиридина в растворе D_2 составляет 1 мкг/см^3, клотримазола-Д5 — 0,1 мкг/см^3.

Срок хранения раствора при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более 3 мес.

Перед применением растворы D_1 и D_2 выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С в воздушной среде не менее 30 мин.

6.3 Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_5

Матричные градуировочные растворы G_1—G_5 готовят в полипропиленовых пробирках вместимостью 50 см^3 из «чистых» проб массой (5,0 ± 0,5) г, в которые вносят рабочие растворы стандартов аналитов C_1—C_3 и рабочий раствор внутренних стандартов D_2 в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_5

Обозначение матричного градуировочного раствора	Вносимый объем рабочего раствора внутренних стандартов D_2, см^3	Вносимый объем рабочего раствора, см^3		
		C_3	C_2	C_1
G_1	0,1	0,05	—	—
G_2	0,1	0,25	—	—
G_3	0,1	—	0,05	—
G_4	0,1	—	0,25	—
G_5	0,1	—		0,05

Пробирки встряхивают в шейкере 1 мин и проводят дальнейшую обработку растворов согласно 7.2.2.

Массовые концентрации стандартов аналитов в матричных градуировочных растворах G_1—G_5 представлены в таблице 3.

Таблица 3

Обозначение матричного градуировочного раствора	Массовая концентрация аналитов в матричных градуировочных растворах, мкг/см^3							
	Рифампицин	Колхицин	Клотианидин	Имидаклоприд	Дапсон	Нистатин	Фумагиллин	Клотримазол
G_1	1	1	1	1	1	5	5	0,1
G_2	5	5	5	5	5	25	25	0,5

Окончание таблицы 3

Обозначение матричного градуировочного раствора	Массовая концентрация аналитов в матричных градуировочных растворах, мкг/см^3							
	Рифампицин	Колхицин	Клотианидин	Имидаклоприд	Дапсон	Нистатин	Фумагиллин	Клотримазол
G_3	10	10	10	10	10	50	50	1,0
G_4	50	50	50	50	50	250	250	5,0
G_5	100	100	100	100	100	500	500	10,0

Срок хранения растворов G_1—G_5 при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 24 ч.

6.4 Подготовка прибора к измерениям

6.4.1 Хромато-масс-спектрометр включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры рабочих режимов масс-спектрометрического детектирования и хроматографического разделения.

6.4.2 Например, для колонки длиной 150 мм заполненной обращенно-фазовым сорбентом С18 с размером частиц не более 5,0 мкм соблюдают следующие условия хроматографического анализа:

- температура колонки — 40 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,3 см^3/мин;
- объем вводимой пробы — 10 мм^3.

6.4.3 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление подвижных фаз А и Б — по 6.1.1): с 0,0 по 1,0 мин — градиентное элюирование 70 % подвижной фазы А; с 1,0 по 12,0 мин — градиентное элюирование от 70 % до 5 % фазы А; с 12,0 по 12,1 мин — переход от 5 % до 70 % фазы А; с 12,1 по 21,0 мин — уравновешивание колонки в 70 % фазы А.

6.4.4 Общие параметры настройки масс-спектрометрического детектора:

- разрешение квадруполей Q1/Q3 — единичное;
- поток газа для фрагментации (CAD) — 6 Psi (0,41 бар);
- режим работы источника — ионизация электроспреем, ESI;
- напряжение на распыляющем капилляре (IS) при регистрации положительных ионов — 5500 В;
- температура источника — 450 °С.

6.4.5 Значения абсолютного времени удерживания, параметры настройки масс-спектрометрического детектора для анализируемых аналитов и соответствующих внутренних стандартов, приведены в таблице 4.

Таблица 4 — Параметры настройки масс-спектрометрического детектора для регистрации положительных ионов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM)

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Время удерживания, мин	Энергия столкновений, эВ/ Потенциал на выходе из ячейки, В
Клотримазол	277,2	165,0/199,1	8,64	30/15 35/15
Рифампицин	824,1	792,2/400,0	10,80	23/10 31/30
Фумагиллин	459,2	177,1/131,1	12,70	17/10 40/10
Нистатин	926,6	297,0/691,3	10,50	33/15 33/15
Колхицин	400,2	358,1/382,0	8,56	29/12 29/13

Окончание таблицы 4

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Время удерживания, мин	Энергия столкновений, эВ/ Потенциал на выходе из ячейки, В
Имидаклоприд	256,1	175,2/209,1	3,80	24/13 22/13
Клотианидин	250,1	169,1/132,1	4,00	18/13 22/13
Дапсон	249,1	108,0/156,0	2,57	19/13 13/13
Клотримазол-Д5	282,1	170,1	8,64	30/13
Рифампицин-Д3	827,2	795,2	10,80	25/15
Колхицин-Д3	403,2	310,1	8,56	34/12
Рокситромицин-Д7	844,7	686,4	9,32	31/10
Сульфапиридин	250,1	184,1	1,80	25/10

Примечание — Приведенные выше параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования могут отличаться в зависимости от используемого оборудования.

6.4.6 Контроль чувствительности хромато-масс-спектрометра осуществляют введением 10 мм^3 градуировочного раствора G_1 в инжектор хроматографа. Полученное значение соотношения сигнал/шум для каждого MRM перехода определяемого вещества должно быть не менее 10.

6.5 Установление градуировочной характеристики

6.5.1 Установление и расчет градуировочной характеристики проводят в каждой серии анализов с помощью программного обеспечения хромато-масс-спектрометрической системы.

6.5.2 Проводят однократные измерения не менее четырех матричных градуировочных растворов, приготовленных по 6.3, в порядке возрастания их концентраций. Определяют времена удерживания ион-продуктов аналитов и их внутренних стандартов.

Внутренние стандарты для аналитов выбирают в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

Аналит	Внутренний стандарт
Клотримазол	Клотримазол-Д5
Рифампицин	Рифампицин-Д3
Фумагиллин	Рокситромицин-Д7
Нистатин	
Колхицин	Колхицин-Д3
Имидаклоприд	Сульфапиридин
Клотианидин	
Дапсон	

6.5.3 Вычисление площади пика проводят для каждого ион-продукта анализируемых аналитов и их внутренних стандартов. Количественное определение аналитов проводят по одному, наиболее интенсивному, ион-продукту.

6.5.4 Градуировочную характеристику устанавливают в координатах «отношение площади пика ион-продукта аналита к площади пика ион-продукта внутреннего стандарта этого аналита» — «массовая концентрация определяемого аналита в градуировочном растворе к массовой концентрации внутреннего стандарта этого аналита». При построении градуировочной характеристики используют линейную функ-

цию вида $y = a + bx$, при этом квадрат коэффициента корреляции должен быть не менее 0,98. В случае, если значение квадрата коэффициента корреляции менее 0,98, повторяют действия по 6.3 и 6.5.

7 Отбор, подготовка и обработка проб

7.1 Отбор проб

Отбор проб натурального меда — по ГОСТ 19792.

7.2 Подготовка и обработка проб

7.2.1 Подготовка проб меда — по ГОСТ 19792—2017 (подраздел 7.2). Каждую пробу меда анализируют в двух повторностях.

7.2.2 Взвешивают (5,00 ± 0,05) г меда в полипропиленовой пробирке вместимостью 50 см^3, пипеточным дозатором вносят 0,1 см^3 рабочего раствора внутренних стандартов D_2 (см. 6.2.7), добавляют 30 см^3 деионизированной воды. Пробирку помещают в шейкер на 10 мин для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Сливают надосадочный слой в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3.

Полученный экстракт наносят на картриджи для твердофазной экстракции, предварительно активированные 2 см^3 метанола и промытые 2 см^3 деионизированной воды. После прохождения экстракта картриджи промывают смесью метанол — вода (см. 6.1.2) дважды по 10 см^3. Картриджи сушат под вакуумом в течение 5 мин. Элюирование проводят в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см^3, пропуская через картридж последовательно 2 см^3 метанола и 2 см^3 ацетонитрила.

Объединенный элюат помещают в систему отдувки растворителей и концентрируют до 0,2—0,3 см^3. Остаток перерастворяют в 0,5 см^3 деионизированной воды, переносят в микроцентрифужную пробирку и доводят объем деионизированной водой до метки 1 см^3. Полученный раствор центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С, фильтруют через мембранный фильтр, переносят в виалу для автосамплера жидкостного хроматографа и используют для ВЭЖХ-МС/МС измерения.

8 ВЭЖХ-МС/МС измерение

8.1 Для определения остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов проводят ВЭЖХ-МС/МС анализ в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования в условиях хроматографических измерений с параметрами указанными в 6.4.

8.2 Анализ выполняют в виде серии измерений, включающей следующие образцы:

- подвижную фазу А (см. 6.1.1.1);
- «чистую» пробу (см. 5.1);
- матричные градуировочные растворы (см. 6.3);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.2.

8.3 Определяют и регистрируют на хроматограмме времена удерживания пиков двух ион-продуктов каждого аналита, соответствующее времени удерживания, найденному при измерении градуировочных растворов по 6.4.3.

9 Обработка результатов измерений

9.1 В соответствии с данными, полученными при измерении градуировочных растворов, проводят количественную обработку хроматограмм с использованием программного обеспечения.

9.2 Расчеты остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов и площади пика выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

9.3 За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений анализируемой пробы, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r, \qquad (2)$$

где X_1 и X_2 — результаты параллельных определений массовой доли аналитов, мкг/кг;

r — значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 6.

9.4 Если условие (2) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данной методикой измерений. За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие

$$\frac{4 \cdot \left| X_{max} - X_{min} \right| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \le CR_{0,95}, \quad (3)$$

где X_{max}, X_{min} — максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой доли аналита, мкг/кг;

$CR_{0,95}$ — значение критического диапазона для уровня вероятности $P = 0,95$, вычисляемое по формуле для n результатов определений

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r, \quad (4)$$

для $n = 4$

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r, \quad (5)$$

где σ_r — показатель повторяемости, % (в соответствии с таблицей 6).

9.5 Если условие (3) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений остаточного содержания антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов с относительной расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений, указанной в таблице 6 при коэффициенте охвата $k = 2$.

Таблица 6

Аналит	Диапазон измерений содержания аналитов, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, %
Клотримазол	от 0,1 до 1,0 включ.	45	13	22	36
	св. 1 до 10 включ.	32	10	14	28
Рифампицин	от 1 до 10 включ.	38	10	18	28
	св. 10 до 100 включ.	27	8	13	22
Фумагиллин	от 5 до 500 включ.	58	20	28	55
Нистатин	от 5 до 50 включ.	46	17	22	47
	св. 50 до 500 включ.	30	9	14	25
Колхицин	от 1 до 100 включ.	45	13	22	36
Имидаклоприд	от 1 до 10 включ.	58	21	28	58
	св. 10 до 100 включ.	34	11	16	30
Клотианидин	от 1 до 10 включ.	44	13	21	36
	св. 10 до 100 включ.	32	9	15	25
Дапсон	от 1 до 10 включ.	48	12	21	33
	св. 10 до 100 включ.	25	8	12	22

Примечание — Значения относительной расширенной неопределенности, указанные в таблице, соответствуют границам относительной погрешности результатов измерений при $P = 0,95$.

11 Оформление результатов измерений

Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$\overline{X}_i \pm 0{,}01 \cdot U_i \cdot \overline{X}_i \text{ при } P = 0{,}95, \quad (6)$$

где $\overline{X}_i$ — среднеарифметическое значение результатов n определений содержания аналита, признанных приемлемыми по 9.4, 9.5, мкг/кг;

U_i — значение относительной расширенной неопределенности, % (в соответствии с таблицей 6).

12 Контроль стабильности результатов измерений

Контроль стабильности результатов измерений в пределах лаборатории рекомендуется осуществлять по ГОСТ ИСО 5725-6 в ходе анализа каждой серии с использованием контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

УДК 638.162:006.354 МКС 67.180.10

Ключевые слова: мед натуральный, остаточное содержание антибактериальных, антипаразитарных, противогрибковых препаратов, метод определения содержания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Редактор *Д.А. Кожемяк*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 24.02.2022. Подписано в печать 09.03.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru