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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 35319— 2025

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение остаточного содержания клавулановой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2026

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 Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 сентября 2025 г. № 189-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
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 декабря 2025 г. № 1865-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 35319—2025 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 15 апреля 2026 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 «Институт стандартизации», 2026

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

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Определение остаточного содержания клавулановой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Food products. Determination of the residual content of clavulanic acid by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection

Дата введения — 2026—04—15

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на непереработанную и переработанную пищевую продукцию животного происхождения: продукты убоя и мясную продукцию (все виды животных), продукты убоя сельскохозяйственной птицы и продукцию их переработки, яйца птицы и продукты их переработки, молоко и молочные продукты и устанавливает метод определения остаточного содержания клавулановой кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) в диапазоне измерений от 50,0 до 1000,0 мкг/кг (от 0,05 до 1,00 мг/кг).

Настоящий стандарт не распространяется на пищевую продукцию для детского питания.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

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

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

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

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы ветиляционные. Общие требования

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

ГОСТ 4025 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4220 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4288—76 Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытаний

ГОСТ 6709[1)] Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

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

ГОСТ 8756.0 Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

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

ГОСТ 20235.0 Мясо кроликов. Методы отбора образцов. Органолептические методы определения свежести

ГОСТ 20469 Электромясорубки бытовые. Технические условия

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

ГОСТ 26671—2014 Продукты переработки фруктов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 26809.2—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 2. Масло из коровьего молока, спреды, сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты

ГОСТ 27752[2)] Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

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

ГОСТ 29245—91 Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей

ГОСТ 31467—2012 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ 31720–2012 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа

ГОСТ 32951 Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия

ГОСТ 34037 Упаковка стеклянная для химических реактивов и особо чистых химических веществ. Общие технические условия

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

ГОСТ ИСО 5725-6[3)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

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.

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018.

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 72031—2025.

[3)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

3 Сущность метода

Метод основан на извлечении остаточных количеств клавулановой кислоты из анализируемой пробы экстрагирующим раствором с последующим определением их методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Количественное содержание клавулановой кислоты рассчитывают по площади пиков идентифицированных соединений, используя градуировочные характеристики, полученные с применением метода внутреннего стандарта.

4 Требования безопасности и условия выполнения измерений

4.1 При работе с реактивами 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.

4.2 Помещения, в которых проводят измерения и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021 и защищены от действия прямого солнечного или ультрафиолетового излучения.

4.3 Приготовление и использование градуировочных растворов аналитов и их изотопно-меченых аналогов следует проводить в вытяжном шкафу при включенной вентиляции.

4.4 При проведении испытаний соблюдают правила безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением, в соответствии с обязательными требованиями нормативных правовых актов, действующих на территории государства, принявшего настоящий стандарт (при условии наличия сосудов, работающих под давлением).

4.5 При работе с электроприборами следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019, ГОСТ 12.2.007.0, пожаровзрывобезопасности — с ГОСТ 12.1.018 и инструкцией по эксплуатации приборов.

4.6 Помещения, в которых проводят измерение и подготовку проб, должны соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и должны быть оснащены средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.7 К выполнению измерений допускают специалистов, прошедших соответствующий инструктаж, владеющих техникой хромато-масс-спектрометрии и изучивших инструкции по эксплуатации используемых приборов, обученных работе с сосудами, работающими под давлением (при условии наличия сосудов, работающих под давлением).

4.8 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

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

5.1 Для определения остаточного содержания клавулановой кислоты применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуду:

- весы высокого (II) класса точности — по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом *e* не более 0,1 г и действительной ценой деления d не более 0,01 г;
- весы специального (I) класса точности — по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом *e* не более 1 мг и действительной ценой деления d не более 0,1 мг;
- масс-спектрометр с тандемным квадрупольным анализатором, включающий диапазон измерений от 30 до 1100 атомных единиц массы (а.е.м), и относительным средним квадратическим отклонением выходного сигнала (площади пика) не более 10 %, с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС);
- систему высокоэффективной жидкостной хроматографии, оснащенную бинарным насосом со смесителем, термостатом хроматографической колонки, обеспечивающим температуру нагрева до (40 ± 10) °С;
- колонку хроматографическую длиной не менее 250 мм, диаметром не более 5 мм, заполненную силикагелем 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 10—100, 100—1000, 500—5000 мм^3 или по ГОСТ 28311;
- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную с относительным центробежным ускорением не менее 2000 *g* и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 и 50 см^3.

Примечание — В случае отсутствия возможности установки режима центрифугирования в единицах относительного центробежного ускорения *g* следует произвести расчет скорости вращения для конкретной центрифуги *S*, об/мин, по формуле

$$S = \sqrt{\frac{g}{(1{,}118 \cdot 10^{-5}) \cdot R}}, \quad (1)$$

где g — относительная центробежная сила;

R — радиус ротора, см;

$(1{,}118 \cdot 10^{-5})$ — коэффициент, учитывающий зависимость центробежного ускорения от скорости ротора и расстояния между частицей и осью вращения;

- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 кГц и объемом не менее 1000 см^3;
- встряхиватель (шейкер) вибрационного, ротационного, линейного или орбитального типа для пробирок;
- мясорубку бытовую по ГОСТ 4025 или электромясорубку по ГОСТ 20469 с отверстиями решетки не более 4 мм[1)];
- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;
- часы электронно-механические — по ГОСТ 27752;
- камеру лабораторную морозильную с рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С;
- холодильник бытовой с рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С;
- картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 см^3, заполненные слабым анионообменным сорбентом (WAX) с диаметром частиц не более 60 мкм, массой 60 мг;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 и 50 см^3 с навинчиваемыми пластмассовыми крышками;
- бутыли стеклянные с горловиной под крышку с винтовой резьбой вместимостью 1000 см^3 по ГОСТ 34037;
- виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2,0 см^3 с навинчиваемыми крышками и тефлоновыми прокладками диаметром 9 мм;
- колбы вместимостью Кн-250(1000)-24/29ТС см^3 по ГОСТ 25336;
- колбы 2—10—2 по ГОСТ 1770;
- стакан 8 по ГОСТ 9147, вместимостью 2000 дм^3;
- цилиндры 1—50(100,1000)—2 по ГОСТ 1770;
- пробы, не содержащие клавулановую кислоту, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, в зависимости от типа исследуемой матрицы («чистые пробы»[2)]);
- палочки из боросиликатного стекла.

5.2 При определении остаточного содержания клавулановой кислоты применяют следующие реактивы:

- ацетонитрил для ВЭЖХ;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды;

[1)] Не обязательно при наличии лабораторного гомогенизатора.

[2)] Срок хранения «чистых проб» при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более 3 мес.

- гексан, о.с.ч. или LC-MS grade;
- калий двухромовокислый по ГОСТ 4220, х.ч;
- кислоту муравьиную, о.с.ч. или LC-MS grade;
- кислоту серную по ГОСТ 4204, х.ч;
- метанол-яд по ГОСТ 6995, х.ч. или карбинол (метанол) для ВЭЖХ.

5.3 При определении остаточного содержания клавулановой кислоты в качестве образцов сравнения применяют следующие соединения с массовой долей основного вещества не менее 90 %:

5.3.1 Стандартный образец — клавуланат калия, CAS 61177-45-5.

5.3.2 В качестве внутреннего стандарта — изотопно-меченый пенициллин G D7 этилпиперидиновая соль, CAS 1217445-37-8[1)].

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. Средства измерения должны быть исправны и поверены.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка лабораторной посуды

6.1.1 Стеклянную лабораторную посуду замачивают в течение 4 ч в 3 %-ном растворе двухромовокислого калия в серной кислоте. Далее промывают посуду в проточной водопроводной воде с последующим многократным ополаскиванием дистиллированной водой. После высушивания в сушильном шкафу посуду хранят в сухом месте при комнатной температуре.

6.1.2 Приготовление 3 %-ного раствора двухромовокислого калия

В фарфоровый стакан вместимостью 2000 $см^3$ вносят (30,0 ± 0,1) г двухромовокислого калия, добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды и перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения. Затем осторожно, при постоянном перемешивании стеклянной палочкой, приливают 1 $дм^3$ концентрированной серной кислоты.

После остывания раствор осторожно переливают в толстостенную бутыль с навинчиваемой крышкой.

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

6.2 Приготовление растворов

6.2.1 Приготовление подвижных фаз А и Б

6.2.1.1 Для приготовления подвижной фазы А в стеклянную бутыль вносят 990 $см^3$ ацетонитрила и 10 $см^3$ муравьиной кислоты, перемешивают и дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5 мин.

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

6.2.1.2 Для приготовления подвижной фазы Б в стеклянную бутыль вносят 995 $см^3$ деионизированной воды и 5 $см^3$ муравьиной кислоты, перемешивают и дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5 мин.

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

6.2.2 Приготовление раствора смеси ацетонитрила и муравьиной кислоты

В коническую колбу вместимостью 250 $см^3$ вносят 100 $см^3$ ацетонитрила и 5 $см^3$ муравьиной кислоты, перемешивают.

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

6.2.3 Приготовление раствора для экстракции

В коническую колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят 900 $см^3$ дистиллированной воды, 100 $см^3$ раствора ацетонитрила (см. 6.2.2), перемешивают.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С не более двух дней.

[1)] В качестве внутреннего стандарта допускается применение изотопно-меченых веществ: клавулановой кислоты D4 и пенициллина G.

6.2.4 Приготовление раствора смеси ацетонитрила и деионизированной воды в объемном соотношении 1:1

В коническую колбу вместимостью 250 см^3 вносят 50 см^3 деионизированной воды и 50 см^3 ацетонитрила, перемешивают.

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

6.2.5 Приготовление раствора для элюирования

В колбу вместимостью 250 см^3 вносят 100 см^3 раствора ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4) и 5 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

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

6.2.6 Приготовление растворов стандартных образцов

6.2.6.1 Приготовление исходного раствора стандарта клавулановой кислоты C_0 с массовой концентрацией 500 мкг/см^3

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 8,0—12,0 мг[1)] стандартного образца клавулановой кислоты и добавляют раствор ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4) из расчета 2,0 см^3 на 1,0 мг стандартного образца в пересчете на чистое вещество по формуле

$$m = \frac{M \cdot m_c \cdot P_a}{M_c \cdot 100}, \quad (2)$$

где M — молярная масса клавулановой кислоты — 199,16 г/моль;

m_c — масса навески используемого стандартного образца, г;

M_c — молярная масса используемого стандартного образца, г/моль;

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

100 — коэффициент пересчета содержания основного вещества в стандартном образце.

Затем пробирку помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

Раствор C_0 хранят в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой при температуре не выше минус 18 °С не более одного года.

6.2.6.2 Приготовление стандартного раствора С1 с массовой концентрацией аналита 10 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 0,2 см^3 исходного раствора C_0 (см. 6.2.6.1), добавляют до метки раствор ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4), перемешивают.

Раствор C_1 хранят в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой при температуре не выше минус 18 °С не более 6 мес.

6.2.6.3 Приготовление стандартного раствора С2 с массовой концентрацией аналита 1 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1,0 см^3 раствора C_1 (см. 6.2.6.2), добавляют до метки раствор ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4), перемешивают.

Раствор C_2 хранят в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 см^3 при температуре не выше минус 18 °С не более 1 мес.

Перед применением растворы C_0, C_1, C_2 выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С не менее 10 мин в воздушной среде и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

6.2.6.4 Приготовление исходного раствора внутреннего стандарта D_0 с массовой концентрацией 1 мг/см^3

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 8,0—12,0 мг[2)] внутреннего стандарта пенициллина G D7 этилпиперидиновая соль [без пересчета на чистое вещество; допускается пересчет на чистое вещество по формуле (2)], добавляют раствор ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4) из расчета 1,0 см^3 на 1,0 мг внутреннего стандарта.

Срок хранения раствора D_0 при температуре не выше минус 18 °С не более одного года.

[1)] Допускается взятие навески стандартного образца, отличающейся от указанного диапазона в зависимости от фасовки и физико-химических свойств вещества.

[2)] Допускается взятие навески, отличающейся от указанного диапазона в зависимости от фасовки и физико-химических свойств вещества.

6.2.6.5 Приготовление раствора внутреннего стандарта D_1 с массовой концентрацией аналита 10 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 0,1 см^3 раствора D_0 (см. 2.6.4), добавляют до метки раствор ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4), перемешивают.

Раствор D_1 хранят в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой при температуре не выше минус 18 °С не более одного года.

6.2.6.6 Приготовление раствора внутреннего стандарта D_2 с массовой концентрацией аналита 1 мкг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1,0 см^3 раствора D_1 (см. 6.2.6.5), добавляют до метки раствор ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4), перемешивают.

Раствор D_2 хранят в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой при температуре не выше минус 18 °С не более 6 мес.

Перед применением растворы D_0, D_1, D_2 выдерживают при температуре от 15 °С до 25 °С не менее 30 мин в воздушной среде и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

6.3 Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_6

Матричные градуировочные растворы G_1—G_6 готовят в полипропиленовых пробирках вместимостью 15 см^3 из «чистых» проб массой (1,00 ± 0,05) г, в которые вносят стандартные растворы определяемых аналитов C_1, C_2 и раствор внутреннего стандарта D_2 в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_6

Обозначение и массовая концентрация матричного градуировочного раствора	Вносимый объем рабочего раствора внутреннего стандарта D_2, см^3	Вносимый объем рабочего раствора, см^3	
		C_1	C_2
G_1(50 нг/см^3)	0,05	—	0,05
G_2(100 нг/см^3)	0,05	—	0,10
G_3(250 нг/см^3)	0,05	—	0,25
G_4(500 нг/см^3)	0,05	0,050	—
G_5(750 нг/см^3)	0,05	0,075	—
G_6(1000 нг/см^3)	0,05	0,100	—

Пробирки встряхивают в вортексе в течение 1 мин и проводят дальнейшую обработку растворов согласно 7.2.1.2.

Срок хранения растворов G_1—G_6 при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч.

6.4 Установление градуировочной характеристики

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

6.4.2 Проводят измерения матричных градуировочных растворов не менее четырех уровней, приготовленных по 6.3. Осуществляют не менее двух параллельных измерений и определяют время удерживания ион-продуктов аналита и его внутреннего стандарта.

6.4.3 Вычисление площади пика проводят для каждого ион-продукта анализируемомого соединения и внутреннего стандарта. Количественное определение проводят по одному ион-продукту, с лучшим соотношением сигнал/шум. Допускается количественное определение аналитов по сумме откликов двух ион-продуктов.

6.4.4 Градуировочную характеристику устанавливают в координатах «отношение площади пика масс-иона определяемого аналита к площади пика масс-иона внутреннего стандарта этого аналита» — «массовая концентрация определяемого аналита в градуировочном растворе к массовой концентрации внутреннего стандарта этого аналита».

При построении градуировочной характеристики используют линейную функцию вида $y = a + bx$, при этом квадрат коэффициента корреляции должен быть не менее 0,98.

6.4.5 При установлении градуировочной характеристики в качестве внутреннего стандарта используют изотопно-меченый пенициллин G D7 этилпиперидиновая соль.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб мяса и мясной продукции, субпродуктов — по ГОСТ 7269, ГОСТ 20235.0, мясных полуфабрикатов — по ГОСТ 32951, кулинарных изделий и полуфабрикатов из рубленого мяса — по ГОСТ 4288.

7.1.2 Отбор проб мяса птицы, пищевых субпродуктов и полуфабрикатов из мяса птицы — по ГОСТ 31467, консервов — по ГОСТ 8756.0.

7.1.3 Отбор проб колбасных изделий и продуктов из свинины, в т. ч. шпика со шкурой и без шкуры, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц — по ГОСТ 9792, мясных полуфабрикатов — по ГОСТ 32951, консервов — по ГОСТ 8756.0.

7.1.4 Отбор проб яиц — по ГОСТ 31654, яичных продуктов — по ГОСТ 31720.

7.1.5 Отбор проб молока и молочных продуктов (в том числе с высоким содержание жира) — по ГОСТ 26809.1 и ГОСТ 26809.2.

7.1.6 При осуществлении отбора проб допускается применять другие нормативные документы, действующие на территории государства — участника Соглашения, принявшего настоящий стандарт.

7.1.7 Отобранные пробы, при отсутствии возможности испытаний в день отбора, хранят при условиях, указанных изготовителем в течение периода, не превышающего срок годности продукции, установленный изготовителем.

7.2 Подготовка проб

7.2.1 Подготовка проб мяса, мясной продукции, мяса и продуктов из мяса птицы, субпродуктов, яиц, яичных продуктов, молока и молочных продуктов

7.2.1.1 Пробы продуктов убоя и мясной продукции предварительно освобождают от грубой соединительной ткани, снимают оболочку с изделий и по возможности освобождают от обсыпки, начинки и других ингредиентов, в том числе немясных компонентов, после чего дважды тщательно измельчают на мясорубке и/или гомогенизируют.

Подготовку мяса птицы, пищевых субпродуктов и полуфабрикатов из мяса птицы проводят по ГОСТ 31467—2012 (раздел 6), консервов — по ГОСТ 26671—2014 (раздел 6).

Подготовку проб кулинарных изделий и полуфабрикатов из рубленого мяса проводят по ГОСТ 4288—76 (пункт 2.4.2), консервов — по ГОСТ 26671—2014 (раздел 6).

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе до однородной массы. Восстановление сухого меланжа, белка или желтка проводят по ГОСТ 31720—2012 (по 5.4.3). Подготовку проб яичной продукции проводят по ГОСТ 31720—2012 (пункт 5.3.3).

Подготовку проб молока и молочных продуктов проводят по ГОСТ 26809.1—2014 (раздел 6). Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245—91 (пункт 3.4). Концентрированное молоко разводят деионизированной водой по ГОСТ 29245—91 (пункт 3.3).

Подготовку проб сыра проводят по ГОСТ 26809.2—2014 (пункт 5.3.25).

Подготовку проб масла из коровьего молока проводят по ГОСТ 26809.2—2014 (подраздел 5.2).

7.2.1.2 Из пробы, подготовленной в соответствии с 7.2.1.1, отбирают навеску (1,00 ± 0,05) г в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 $см^3$, дозатором вносят 0,05 $см^3$ раствора внутреннего стандарта D_2 (см. 6.2.6.6) и выдерживают 20 мин в темном месте. Осторожно приливают 3,0 $см^3$ буферного раствора для экстракции (см. 6.2.3). Пробирку помещают на 10 мин в шейкер для экстракции. Затем центрифугируют при 2000 *g* в течение 10 мин при температуре 4 °С. Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ) по 7.2.2.

7.2.1.3 В случае большого количества жировой фракции в экстракте его в полном объеме переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 $см^3$, осторожно вносят 2 $см^3$ гексана и помещают на 5 мин в шейкер для экстракции. Затем центрифугируют при 2000 *g* в течение 10 мин при температуре 4 °С. Верхний гексановый слой удаляют, полученный экстракт очищают методом ТФЭ по 7.2.2.

7.2.2 Очистка подготовленных проб методом ТФЭ

Картридж для ТФЭ предварительно промывают, пропуская последовательно 2 $см^3$ метанола, 2 $см^3$ ацетонитрила и 2 $см^3$ раствора для экстракции (см. 6.2.3). Полученный экстракт в полном объеме (см. 7.2.1.2, 7.2.1.3) наносят на картридж. Затем картридж промывают 2 $см^3$ раствора ацетонитрила и деионизированной воды (см. 6.2.4), просушивают, элюируют 1 $см^3$ раствора для элюирования (см. 6.2.5). Элюат переносят в виалу и используют для ВЭЖХ-МС/МС измерения.

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия хроматографического разделения

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

8.1.2 Например, для колонки длиной 250 мм, заполненной силикагелем с размером частиц не более 5,0 мкм, соблюдают следующие условия хроматографического анализа:

- температура термостата колонки — 20 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,4 $см^3$/мин;
- объем вводимой пробы — 20 $мм^3$.

8.1.3 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление подвижных фаз А и Б по 6.2.1) в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Условия хроматографического разделения

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б,%
0,0	95	5
5,0	0	100
10,0	0	100
10,1	95	5
14,0	95	5

8.1.4 Общие параметры настройки масс-спектрометрического детектора:

- температура источника (TEM) — 400 °С;
- напряжение на капилляре (IS) — 4500 В;
- разрешение квадруполей Q1/Q3 — Unit;
- значение вспомогательного газа (CUR) — 25;
- значение газа источника ионов (GS1) — 45;
- значение распыляющего газа (GS2) — 45;
- значение газа ячейки коллизий (CAD) — High.

8.1.5 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора в отрицательном режиме MRM в условиях электрораспыления приведены в таблице 3.

Таблица 3

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z	Потенциал декластеризации, В	Энергия соударений, эВ/Потенциал на выходе из ячейки соударений, В
Клавулановая кислота	198,3	136,0*	–70	–10/–9
		108,0	–60	–18/–11
Пенициллин G D7	340,0	199,0	–66	–15/–14
* Рекомендуемый ион-продукт для проведения количественного определения.				

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

8.2 ВЭЖХ-МС/МС измерение

8.2.1 Для определения остаточного содержания клавулановой кислоты проводят ВЭЖХ-МС/МС измерение в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования в условиях хроматографических измерений с параметрами, указанными в 8.1.

8.2.2 Выполняют серию измерений, включающую следующие образцы:
- подвижную фазу А (см. 6.2.1.1);
- «чистую пробу»;
- градуировочные растворы (см. 6.3);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

9 Обработка результатов измерений

9.1 В соответствии с данными, полученными при измерении градуировочных растворов, проводят количественную обработку хроматограмм с использованием программного обеспечения. Метод обработки хроматограмм — внутренний стандарт.

9.2 Содержание клавулановой кислоты в пробе X, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C \cdot V_{пр}}{m}, \quad (3)$$

где C — массовая концентрация клавулановой кислоты, полученная по градуировочному графику, нг/см^3;

$V_{пр}$ — конечный объем раствора после подготовки пробы, см^3;

m — масса навески пробы, г.

Допускается расчет содержания клавулановой кислоты в пробе сухого или концентрированного молока, сухих яичных продуктов (меланжа, белка или желтка) X, мкг/кг, по формуле

$$X = K\frac{C \cdot V_{пр}}{m}, \quad (4)$$

где K — коэффициент, учитывающий восстановление сухих молочных и сухих яичных продуктов (меланжа, белка или желтка), разведение концентрированного молока. Коэффициент K рассчитывают по формуле

$$K = \frac{m_{вост}}{m_{сух(конц)}}, \quad (5)$$

где $m_{восст}$ — масса восстановленного продукта, г;

$m_{сух(конц)}$ — масса сухого (концентрированного) продукта, взятого для восстановления, г.

Допускается проводить расчеты остаточного содержания клавулановой кислоты системой обработки данных в автоматическом режиме.

9.3 За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений анализируемой пробы, полученных в условиях повторяемости,

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (6)$$

если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |X_1 + X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r, \quad (7)$$

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

100 — коэффициент перевода, %;

r — значение предела повторяемости, % (в соответствии с таблицей 4).

9.4 Если условие (7) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данным методом измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие

$$\frac{4 \cdot |X_{max} + X_{min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}, \quad (8)$$

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

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

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r, \quad (9)$$

для n = 4

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r, \quad (10)$$

где σ_r — показатель повторяемости, % (в соответствии с таблицей 4).

9.5 Если условие (8) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями метода измерений.

9.6 Конечный результат округляют до десятичного знака.

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений остаточного содержания клавулановой кислоты с относительной расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений, указанной в таблице 4, при коэффициенте охвата k = 2 и доверительной вероятности P = 0,95.

Таблица 4 — Показатели точности метода (значения относительной расширенной неопределенности результатов измерений, относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости)

Объект	Диапазон измерений содержания аналитов, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, %
Мясо, мясная продукция, мясо птицы, продукты из мяса птицы, молоко и молочные продукты, сыр	От 50 до 500 включ.	27	7	12	20
	Св. 500 до 1000 включ.	19	3	9	8
Субпродукты, яйца и яичные продукты	От 50 до 500 включ.	29	8	14	22
	Св. 500 до 1000 включ.	20	6	9	17

11 Оформление результатов измерений

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

$$\overline{X_i} \pm 0,01 \cdot U_i \cdot \overline{X_i}, \text{ при } P = 0,95, \quad (11)$$

где $\overline{X_i}$ — среднее арифметическое значение результатов n параллельных измерений содержания i-го аналита в анализируемой пробе, мкг/кг;

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания i-го аналита для соответствующего диапазона измерений, % (см. таблицу 4).

Конечный результат округляют до первого десятичного знака и выражают в микрограммах на килограмм.

Допускается представление результата в мг/кг путем деления значения содержания клавулановой кислоты, полученного в соответствии с разделом 9, и значения расширенной неопределенности в абсолютных единицах (мкг/кг) на 1000 (с сохранением количества значимых цифр).

Допускается представление результата для проб сухого или концентрированного молока, сухих яичных продуктов (меланжа, белка или желтка), если в результате пересчета на сухое вещество полученное значение превышает верхний предел диапазона измерения; значение неопределенности следует использовать из диапазона, соответствующего полученному значению для восстановленного продукта.

В случае содержания клавулановой кислоты в пробе более верхнего значения диапазона количественного определения вносится запись: «более [верхнее значение] мкг/кг». В случае содержания клавулановой кислоты в пробе менее нижнего значения диапазона количественного определения, вносится запись: «менее [нижнее значение] мкг/кг».

12 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в руководстве по качеству лаборатории или других внутренних документах лаборатории, но не реже чем через каждые 20—30 измерений.

Рекомендуется использование контрольных карт Шухарта в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6.

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.

Приложение А
(справочное)

Время выхода и интенсивность пиков клавулановой кислоты и пенициллина G D7

Пример выхода пиков клавулановой кислоты и пенициллина G D7 на хроматограмме, полученной при измерении пробы (мышечной ткани) в условиях 8.1, градуировочный уровень G4, 500 нг/см^3, приведен на рисунке А.1.

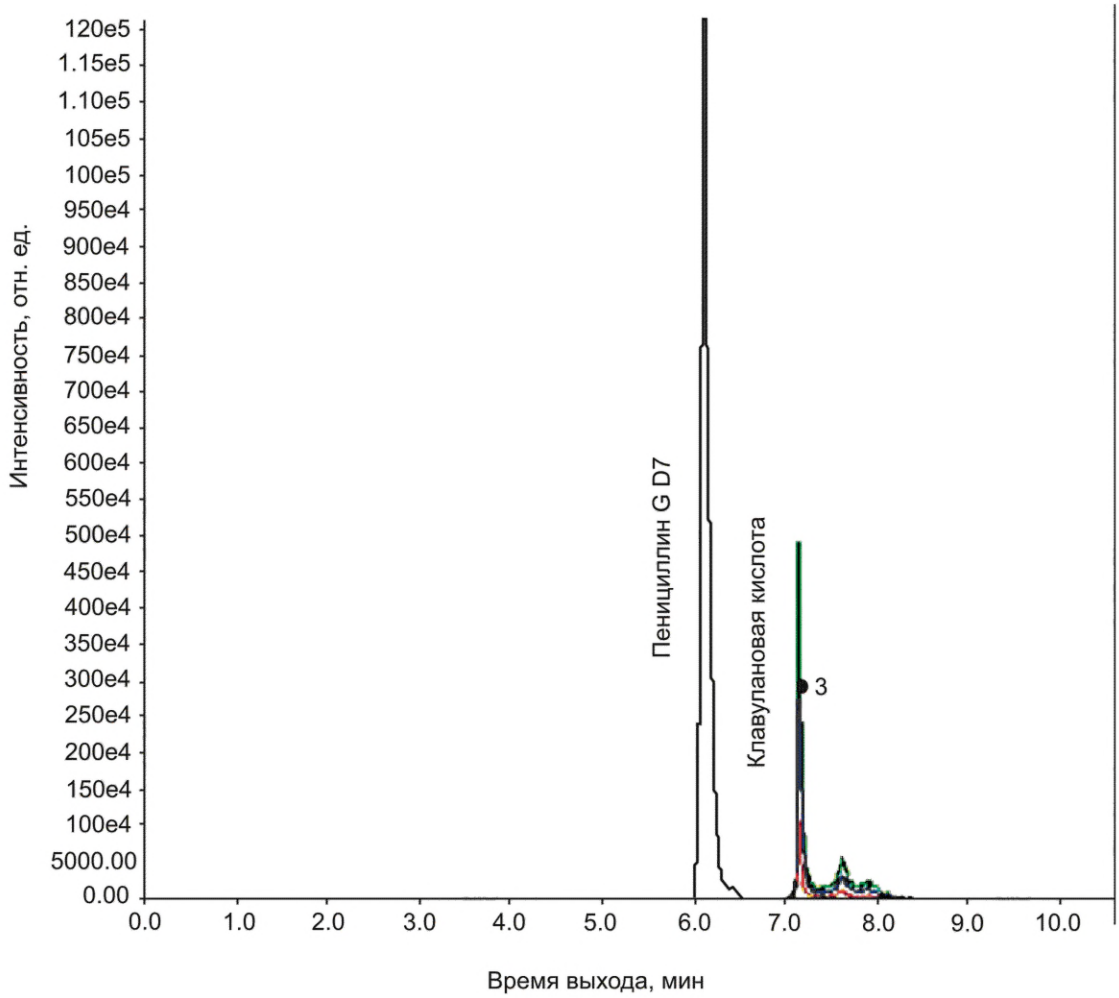

Рисунок А.1 — Хроматограмма клавулановой кислоты и пенициллина G D7 (градуировочный уровень G 4, 500 нг/см^3)

УДК 637.07:638.162:006.354

МКС 67.100.10
67.100.20
67.100.30
67.120.10
67.120.20

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, клавулановая кислота, определение остаточного содержания, ВЭЖХ-МС/МС измерение

Редактор *М.В. Митрофанова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 12.01.2026. Подписано в печать 12.02.2026. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,12.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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