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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34533— 2019

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

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 по стандартизации МТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 июня 2019 г. № 55)

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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 14 августа 2019 г. № 498-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34533—2019 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 апреля 2020 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»

© Стандартинформ, оформление, 2019

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

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Food products, food raw materials. Method for determination of sulfonamides, nitroimidazoles, penicillins, amphenicols by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

Дата введения — 2020—04—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и продовольственное сырье — молоко, молочные продукты, яйца, яичный порошок, яичный меланж, мясо и мясные продукты (все виды животных), мясо и продукты из мяса птицы, мед, рыбу, морепродукты и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС) для определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов.

Диапазон измерений для хлорамфеникола — от 0,2 до 1000 мкг/кг, для остальных соединений — от 1,0 до 1000,0 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие 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 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.2.085 Сосуды, работающие под давлением. Клапаны предохранительные. Требования безопасности

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

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

ГОСТ 2603 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике*

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

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

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 19792—2017 Мед натуральный. Технические условия

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

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

Издание официальное

ГОСТ 26809.2 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 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

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

ГОСТ 31339 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 31467 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 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа

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

3 Сущность метода

Метод основан на извлечении сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов из анализируемой пробы ацетонитрилом с последующим количественным определением их методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций.

Количественное определение проводят методом внутреннего стандарта.

4 Условия выполнения измерений и требования безопасности

4.1 При выполнении измерений соблюдают 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 по ГОСТ 12.1.007, при работе с ними необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

4.3 Помещения, в которых проводят анализ и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

4.4 Приготовление градуировочных растворов проводят под тягой в вытяжном шкафу.

4.5 При проведении испытаний соблюдают правила безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением, по ГОСТ 12.2.085.

4.6 При выполнении измерений на хромато-масс-спектрометре следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

4.7 К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих высшее специальное образование, прошедших соответствующий инструктаж, владеющих техникой хромато-масс-спектрометрии и изучивших инструкции по эксплуатации используемых приборов.

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

5.1 Для определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1, с максимальной нагрузкой не более 150 г и пределами допускаемой абсолютной погрешности взвешивания не более ±0,001 г;

- весы высокого класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности взвешивания не более ±0,1 мг;

- масс-спектрометр диапазоном измерений от 50 до 500 атомных единиц массы (а. е. м.), с массовым разрешением не менее 500, точностью измерения массы не ниже 0,1 а. е. м., 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 ± 1) °С;

- колонку хроматографическую*, заполненную обращенно-фазовым сорбентом с частицами размером не более 5 мкм, длиной 150 мм;

- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;

- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;

- картриджи для твердофазной экстракции** вместимостью не менее 3 $см^3$, заполненные обращенно-фазовым сорбентом с частицами диаметром не более 50 мкм;

- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;

- встряхиватель (шейкер) вибрационный для пробирок орбитального типа движения с амплитудой встряхивания не менее 3 мм и диапазоном скоростей от 150 до 2500 об/мин;

- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения ротора не менее 4000 об/мин и диапазоном температур охлаждения от 4 °С до 20 °С, с адаптером для пробирок вместимостью 15 $см^3$;

- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 кГц и объемом не менее 1 $дм^3$;

- шкаф сушильный с максимальной температурой нагрева не менее 110 °С и погрешностью поддержания заданной температуры ±5 °С;

- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением не более 18,2 МОм·см при температуре 20 °С;

- 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;

- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 $см^3$ с навинчиваемыми пластмассовыми крышками;

- виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 $см^3$ с навинчиваемыми крышками и тефлоновыми прокладками диаметром 9 мм;

- фильтры мембранные с порами диаметром не более 0,2 мкм;

- пробы, не содержащие сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, в зависимости от типа исследуемой матрицы («чистые» пробы***);

- пипетки одноканальные переменной вместимостью 10—100, 200—1000 $мм^3$, 1—5 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±2 %;

- колбы 2–10(100, 1000)–2 по ГОСТ 1770;

- пипетки 2–2–1–10 по ГОСТ 29227;

- цилиндр 1–500–1 по ГОСТ 1770;

- ступку 3, пестик 2 по ГОСТ 9147.

5.2 При определении остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов применяют следующие реактивы:

- ацетон по ГОСТ 2603;

---

* Например, типов Agilent Pursuit XRs C18, Phenomenex Luna C18. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других колонок с аналогичными характеристиками.

** Например, моделей Waters Oasis HLB, Phenomenex Strata X. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других моделей с аналогичными характеристиками.

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

- метанол-яд по ГОСТ 6995, х. ч.;
- ацетонитрил для ВЭЖХ с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды.

5.3 При определении остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов применяют:

5.3.1 Стандартные образцы сульфаниламидов с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %:

- сульфахлорпиридазин;
- сульфатиазол;
- сульфадиметоксин;
- сульфахиноксалина натриевая соль;
- сульфапиридин;
- сульфаметазин;
- сульфамеразин;
- сульфадиазина натриевая соль;
- триметоприм;
- сульфамоксол;
- сульфаэтоксипиридазин;
- сульфаметоксазол;
- сульфагуанидин моногидрат;
- сульфаметоксипиридазин;
- сульфаниламид.

5.3.2 Стандартные образцы нитроимидазолов с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %:

- ронидазол;
- диметридазол;
- метронидазол;
- гидроксиметронидазол;
- ипронидазол;
- гидроксиипронидазол;
- гидроксиметилметилнитроимидазол;
- тинидазол;
- тернидазол.

5.3.3 Стандартные образцы пенициллинов с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %:

- оксациллин;
- амоксициллина тригидрат;
- клоксациллина натриевая соль;
- диклоксациллина натриевая соль;
- ампициллина тригидрат;
- бензилпенициллин;
- феноксиметилпенициллин;
- нафциллина натриевая соль.

5.3.4 Стандартные образцы амфениколов с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %:

- хлорамфеникол;
- флорфеникол амин;
- флорфеникол;
- тиамфеникол.

5.3.5 Внутренние стандарты сульфаниламидов с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %:

- сульфатиазол-D_4;
- сульфадиметоксин-D_4;
- сульфаметазин-D_4;
- сульфадиазин-D_4;
- триметоприм-D_9;
- сульфаметоксазол-D_4.

5.3.6 Внутренние стандарты нитроимидазолов с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %:

- ронидазол-D_3;
- диметридазол-D_3;
- метронидазол-D_3;
- гидроксиметилметилнитроимидазол-D_3;
- ипронидазол-D_3;
- гидроксиипронидазол-D_3.

5.3.7 Внутренний стандарт пенициллинов:

- бензилпенициллин-D_7 с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.

5.3.8 Внутренний стандарт амфениколов:

- хлорамфеникол-D_5 с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %.

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

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов

6.1.1 Мойку и сушку посуды проводят в отдельном помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией. Для сушки лабораторной посуды и подготовки реактивов необходимо использовать отдельные сушильные шкафы.

6.1.2 Стеклянную посуду подвергают стандартной процедуре очистки лабораторной посуды с последующей промывкой органическим растворителем — ацетоном (дважды).

6.1.3 Процедуру промывки ацетоном следует проводить в вытяжном шкафу. Рекомендуется на стадиях промывки использовать ультразвуковую баню. Окончательную сушку посуды проводят в сушильном шкафу, установленном в вытяжном шкафу, при температуре от 105 °С до 110 °С.

6.1.4 Каждую новую партию реактивов проверяют на отсутствие контаминации анализируемыми соединениями путем проведения холостого опыта в соответствии с процедурой анализа.

6.2 Приготовление растворов

6.2.1 Приготовление смеси метанола и деионизированной воды в объемном соотношении 1:1

В мерной колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают 500 см^3 деионизированной воды и 500 см^3 метанола. Колбу помещают в ультразвуковую баню на 5 мин.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 3 мес.

6.2.2 Приготовление градуировочных растворов

6.2.2.1 Приготовление исходных растворов C_0 стандартов анализируемых соединений массовыми концентрациями 1000 мкг/см^3

Для приготовления исходных стандартных растворов C_0 рассчитывают массы стандартных образцов m_i (мг), эквивалентные 10,0 мг соответствующих аналитов, по формуле

$$m_i = 10 \cdot \frac{100}{P_i} \cdot \frac{M_i}{M_{\text{аналита } i}}, \quad (1)$$

где P_i — массовая доля основного вещества в i-м стандартном образце, %;

M_i — молярная масса основного вещества в i-м стандартном образце, г/моль;

$M_{\text{аналита } i}$ — молярная масса i-го аналита, г/моль.

Примечание — Значения M_i и $M_{\text{аналита } i}$ применяют при расчете навесок веществ в виде солей, гидратов (сульфахиноксалина натриевая соль, сульфадиазина натриевая соль, сульфагуанидин моногидрат, амоксициллина тригидрат, клоксациллина натриевая соль, диклоксациллина натриевая соль, ампициллина тригидрат, нафциллина натриевая соль).

Взвешивание стандартных образцов с рассчитанными массами проводят с точностью до первого десятичного знака. Для приготовления индивидуальных стандартных растворов C_0 в отдельные мерные колбы вместимостью 10 см^3 каждая вносят рассчитанные массы соответствующих стандартных

образцов, приливают по 8 см^3 метанола [для пенициллинов — по 8 см^3 смеси метанола и деионизированной воды (6.2.1)], перемешивают и помещают колбы в ультразвуковую баню на 1 мин, после чего доводят объемы растворов до 10 см^3 соответствующим растворителем по меткам на колбах.

Срок хранения при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С растворов пенициллинов — не более 4 мес, остальных растворов — не более 1 года.

Перед применением растворы выдерживают в термостате при температуре 20 °С не менее 30 мин.

6.2.2.2 Приготовление рабочих стандартных растворов C_1— C_5

Рабочий стандартный раствор C_1 готовят в мерной колбе вместимостью 100 см^3. Рабочие стандартные растворы C_2— C_5 готовят в мерных колбах вместимостью 10 см^3 в соответствии с рисунком 1.

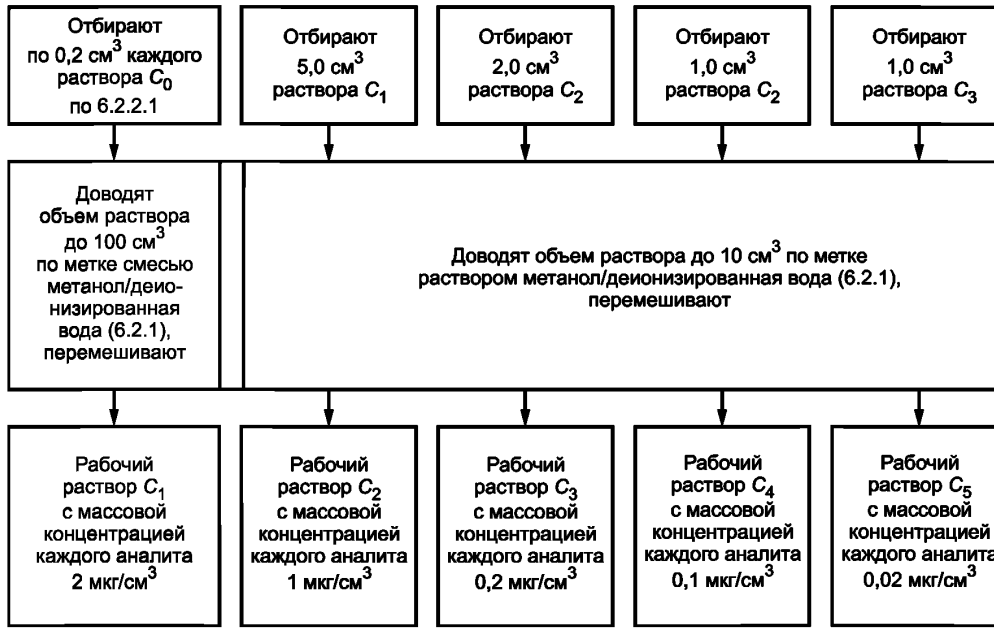


Рисунок 1 — Приготовление рабочих растворов C_1— C_5

Растворы C_1— C_2 хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С не более 3 мес. Растворы C_3— C_5 используют свежеприготовленными.

Перед применением растворы C_1— C_2 выдерживают в термостате при температуре 20 °С не менее 30 мин.

Допускается приготовление рабочих стандартных растворов иных концентраций в заданном диапазоне измерений.

6.2.2.3 Приготовление исходных растворов D_0 внутренних стандартов анализируемых соединений массовыми концентрациями 1000 мкг/см^3

Для приготовления исходных растворов внутренних стандартов D_0 рассчитывают массы внутренних стандартов m_i (мг), эквивалентные 10,0 мг соответствующих аналитов, по формуле (1).

Взвешивание образцов внутренних стандартов с рассчитанными массами проводят с точностью до первого десятичного знака. Для приготовления индивидуальных растворов внутренних стандартов D_0 в отдельные мерные колбы вместимостью 10 м^3 каждая вносят рассчитанные массы соответствующих внутренних стандартов, приливают по 8 см^3 метанола [(для пенициллинов — по 8 см^3 смеси метанола и деионизированной воды (6.2.1)], перемешивают и помещают колбы в ультразвуковую баню на 1 мин, после чего доводят объемы растворов до 10 см^3 соответствующим растворителем по меткам на колбах.

Срок хранения при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С растворов пенициллинов — не более 4 мес, остальных растворов — не более 1 года.

Перед применением растворы выдерживают в термостате при температуре 20 °С не менее 30 мин.

Внутренние стандарты для сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов выбирают в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Аналит	Наименование внутреннего стандарта
Нитроимидазолы	
Диметридазол	Диметридазол-D_3
Ронидазол	Ронидазол-D_3
Ипронидазол	Ипронидазол-D_3
Гидроксиипронидазол	Гидроксиипронидазол-D_3
Метронидазол	Метронидазол-D_3
Гидроксиметронидазол	
Гидроксиметилметилнитроимидазол	Гидроксиметилметилнитроимидазол-D_3
Тернидазол	Ронидазол-D_3
Тинидазол	
Амфениколы	
Хлорамфеникол	Хлорамфеникол-D_5
Флорфеникол	
Флорфеникол амин	
Тиамфеникол	
Сульфаниламиды	
Сульфапиридин	Сульфадиазин-D_4
Сульфадиазин	
Сульфамеразин	
Сульфагуанидин	
Сульфахиноксалин	
Сульфатиазол	Сульфатиазол-D_4
Сульфаметазин	Сульфаметазин-D_4
Сульфахлорпиридазин	
Сульфаниламид	
Сульфаэтоксипиридазин	Сульфаметоксазол-D_4
Сульфаметоксазол	
Сульфаметоксипиридазин	
Сульфамоксол	
Сульфадиметоксин	Сульфадиметоксин-D_4
Триметоприм	Триметоприм-D_9

Окончание таблицы 1

Аналит	Наименование внутреннего стандарта
Пенициллины	
Бензилпенициллин	Бензилпенициллин-D_7
Феноксиметилпенициллин	
Ампициллин	
Оксациллин	
Амоксициллин	Бензилпенициллин-D_7
Диклоксациллин	
Клоксациллин	
Нафциллин	

6.2.2.4 Приготовление рабочего раствора D_1 внутренних стандартов анализируемых соединений

Для приготовления рабочего раствора D_1 переносят по 0,01 см^3 каждого раствора D_0 в мерную колбу вместимостью 10 см^3, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация каждого аналита в растворе D_1 составляет 1 мкг/см^3.

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

Перед применением раствор выдерживают в термостате при температуре 20 °С не менее 30 мин.

6.2.2.5 Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_8

Матричные градуировочные растворы G_1—G_8 готовят в полипропиленовых пробирках вместимостью 15 см^3 из «чистых» проб массой 1,0 г, в которые вносят рабочий раствор внутренних стандартов D_1 и рабочие стандартные растворы определяемых аналитов C_1—C_5 в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_8

Обозначение и массовая концентрация матричного градуировочного раствора	Вносимый объем рабочего раствора, см^3					
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	D_1
G_1 (1000 нг/см^3)	0,5	—	—	—	—	0,05
G_2 (500 нг/см^3)	0,25	—	—	—	—	0,05
G_3 (100 нг/см^3)	—	0,1	—	—	—	0,05
G_4 (50 нг/см^3)	—	0,05	—	—	—	0,05
G_5 (10 нг/см^3)	—	—	0,05	—	—	0,05
G_6 (5 нг/см^3)	—	—	—	0,05	—	0,05
G_7 (1 нг/см^3)	—	—	—	—	0,05	0,05
G_8 (0,2 нг/см^3)	—	—	—	—	0,01	0,05

Пробирки встряхивают в шейкере в течение 1—2 мин, выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин и проводят дальнейшую обработку растворов согласно разделу 7.

Срок хранения растворов G_1—G_8 при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 2 сут.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб мяса, субпродуктов и мясных продуктов — по ГОСТ 7269.

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

7.1.3 Отбор проб молока и молочных продуктов — по ГОСТ 26809.1 и ГОСТ 26809.2.

7.1.4 Отбор проб меда — по ГОСТ 19792.

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

7.1.6 Отбор проб рыбы и морепродуктов — по ГОСТ 31339.

7.1.7 Пробы, отобранные по 7.1.1, 7.1.2, 7.1.6, при отсутствии возможности анализа в день отбора замораживают и хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С до проведения анализа, но не более 2 мес.

7.2 Подготовка проб

7.2.1 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, мяса, субпродуктов и полуфабрикатов из мяса птицы, рыбы и морепродуктов

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани, рыбу — от крупных костей и кожи, креветки — от голов и грубого хитинового покрова. 100 г анализируемой пробы измельчают на гомогенизаторе. Взвешивают 1,0 г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см^3. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см^3 раствора D_1 (6.2.2.4). Пробирку помещают в шейкер для перемешивания на 10 мин. Через 15 мин приливают 4 см^3 ацетонитрила и помещают пробирку на 15 мин в шейкер для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. После центрифугирования верхний органический слой переливают в другую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см^3, помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе воздуха при температуре 40 °С до 0,1—0,2 см^3. К полученному остатку приливают 2 см^3 деионизированной воды, перемешивают и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции по 7.3.

7.2.2 Подготовка проб яиц

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе, меланж тщательно перемешивают. Взвешивают 1,0 г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см^3. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см^3 раствора внутренних стандартов D_1 (6.2.2.4). Пробирку помещают в шейкер для перемешивания на 10 мин. Далее обработку и подготовку проб к хроматографированию проводят по 7.2.1.

7.2.3 Подготовка проб яичного порошка

Отобранную пробу яичного порошка тщательно перемешивают и взвешивают 1,0 г в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см^3. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см^3 раствора внутренних стандартов D_1 (6.2.2.4) и выдерживают 15 мин. Затем приливают 4 см^3 ацетонитрила и помещают пробирку в шейкер на 15 мин для перемешивания. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. Далее обработку и подготовку проб к хроматографированию проводят по 7.2.1.

7.2.4 Обработка проб молока и молочных продуктов

Молоко, сливки, сметану, кисломолочные напитки и продукты перед анализом тщательно перемешивают.

Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245—91 (пункт 3.4).

10 г сыра, творога или творожных изделий тщательно растирают в ступке.

100 г твердого сыра измельчают на гомогенизаторе.

Взвешивают 1,0 г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см^3. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см^3 раствора внутренних стандартов D_1 (6.2.2.4) и выдерживают 15 мин. Затем приливают 4 см^3 ацетонитрила и помещают пробирку в шейкер на 15 мин для перемешивания. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. Далее обработку и подготовку проб к хроматографированию проводят по 7.2.1.

7.2.5 Обработка проб меда

Подготовку проб меда проводят по ГОСТ 19792—2017 (подраздел 7.2). Взвешивают 1,0 г подготовленной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см^3, добавляют 4 см^3 деионизированной воды, помещают пробирку в шейкер на 15 мин для перемешивания. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см^3 раствора внутренних стандартов D_1 (6.2.2.4), перемешивают и используют для твердофазной экстракции по 7.3.

7.3 Очистка подготовленных проб методом твердофазной экстракции

Картриджи для твердофазной экстракции кондиционируют на вакуумном устройстве для твердофазной экстракции, пропуская последовательно 2 см^3 ацетонитрила и 2 см^3 деионизированной воды.

Затем через картридж пропускают полученный в соответствии с 7.2 экстракт (на всех этапах твердофазной экстракции, кроме этапов сушки, вакуум или избыточное давление не применяют). Промывают картридж 2 $см^3$ деионизированной воды, сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 10 мин и элюируют аналиты 2 $см^3$ ацетонитрила в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 $см^3$. Элюат помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе воздуха при температуре 40 °С до 0,1—0,2 $см^3$. К полученному остатку приливают 1 $см^3$ деионизированной воды и помещают в ультразвуковую баню на одну минуту или перемешивают с использованием устройства вортексного типа. Полученный экстракт фильтруют через мембранный фильтр в виалу и используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

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 150 мм с обращенно-фазовым сорбентом с частицами размером не более 5 мкм соблюдают следующие условия хроматографического анализа:

- температура колонки — 40 °С
- скорость потока подвижной фазы — 200 $мм^3$/мин;
- объем вводимой пробы — 20 $мм^3$.

8.1.3 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы А используют деионизированную воду, в качестве подвижной фазы Б — метанол. Измерение каждой пробы проводят дважды: в режиме регистрации положительных ионов и в режиме регистрации отрицательных ионов.

При регистрации положительных ионов: в начальный момент по 0,5 мин — соотношение фаз А/Б по объему (90/10); с 0,5 по 20,0 мин — градиентное элюирование к 40 % фазы Б; с 20,0 по 23,0 мин — соотношение фаз А/Б по объему (60/40); с 23,0 по 23,2 мин — переход к 100 % фазы Б; с 23,2 по 25,0 — подаются 100 % фазы Б; с 25,0 по 33,0 мин — уравновешивание колонки при соотношении фаз А/Б по объему (90/10).

При регистрации отрицательных ионов: в начальный момент до 0,5 мин — соотношение фаз А/Б по объему (75/25); с 0,5 по 4,0 мин — градиентное элюирование до 100 % фазы Б; с 4,0 по 6,5 мин подаются 100 % фазы Б; с 6,5 по 13 мин — уравновешивание колонки при соотношении фаз А/Б по объему (75/25).

Детектирование пиков проводят методом «регистрации множественных реакций» (MRM). Для каждого соединения измеряют сигнал для двух ионов согласно таблице 3.

Таблица 3 — Параметры воздействия на ионы в режиме MRM и условиях электроспрея с регистрацией положительных или отрицательных (—) ионов

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z		Время удерживания, мин
Нитроимидазолы				
Диметридазол	142,1	81,1	96,1	9,5
Диметридазол-D_3*	145,1	99,1		9,3
Ронидазол-D_3*	204,1	143,1		6,5
Ронидазол	201,1	140,1	110,1	6,9
Ипронидазол	170,1	124,1	109,1	19,6
Ипронидазол-D_3*	173,1	127,1		19,4
Гидроксиипронидазол	186,1	168,1	122,1	15,6
Гидроксиипронидазол-D_3*	189,1	171,1		15,3

Продолжение таблицы 3

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z			Время удерживания, мин
Метронидазол	172,1	128,1	82,1		7,3
Гидроксиметронидазол	188,1	123,1	126,1		4,6
Метронидазол-D_3*	175,1	131,1			7,0
Гидроксиметилметилнитроимидазол	158,1	140,1	55,0		5,8
Гидроксиметилметилнитроимидазол-D_3*	161,1	143,1			5,5
Тернидазол	186,1	128,1	82,1		11,3
Тинидазол	248,1	121,1	93,0		10,5
Амфениколы					
Хлорамфеникол	–321,0	152,0	257,0	194,0	7,7
Хлорамфеникол-D_5*	–326,1	157,0			7,7
Хлорамфеникол-D_5*	328,1	280,1			20,5
Флорфеникол	–356,1	185,1	119,1		6,7
Флорфеникол амин	–248,1	230,1	130,1		1,7
Тиамфеникол	–353,9	290,0	184,9		4,3
Сульфаниламиды					
Сульфапиридин	250,1	184,1	156,1		10,0
Сульфадиазин	251,1	156,1	108,1		7,1
Сульфадиазин-D_4*	255,1	160,1			6,7
Сульфатиазол	256,1	156,1	108,1		9,0
Сульфатиазол-D_4*	260,1	160,1			8,7
Сульфамеразин	265,1	156,1	110,1		10,9
Сульфаметазин	279,1	186,1	124,1		14,2
Сульфаметазин-D_4*	283,1	186,1			13,9
Сульфахлорпиридазин	285,1 287,1	156,1 156,1			15,8
Сульфахиноксалин	301,1	156,1	146,1		24,3
Сульфаэтоксипиридазин	295,1	156,1	140,1		20,8
Сульфагуанидин	215,1	156,1	60,1		2,8
Сульфаметоксазол	254,1	156,1	108,1		16,3
Сульфаметоксазол-D_4*	258,1	160,1			16,0
Сульфаметоксипиридазин	281,1	156,1	108,1		14,9
Сульфамоксол	268,1	156,1	113,1		13,6
Сульфаниламид	173,1	156,1	92,1		3,0
Сульфадиметоксин	311,1	156,1	245,1		23,2
Сульфадиметоксин-D_4*	315,1	160,1			23,0

Окончание таблицы 3

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Ион-продукт, m/z		Время удерживания, мин
Триметоприм	291,1	230,1	130,1	7,2
Триметоприм-D_9*	300,1	230,1		6,7
Пенициллины				
Бензилпенициллин	–333,0	289,0	192,0	8,2
Бензилпенициллин-D_7*	–340,0	199,0		8,5
Бензилпенициллин-D_7*	342,1	183,1		27,0
Феноксиметилпенициллин	–349,0	208,0	305,0	8,3
Ампициллин	350,1	192,1	106,1	13,6
Оксациллин	–400,1	259,0	356,1	8,3
Амоксициллин	366,1	114,1	208,0	3,4
Диклоксациллин	–468,0	424,1	327,0	8,5
Клоксациллин	–434,1	390,1	290,1	8,4
Нафциллин	–413,0	272,2	243,2	7,0
* Внутренние стандарты.				

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

8.1.4 Относительное отклонение времени удерживания в анализируемых пробах от градуировочных данных не должно превышать 2,5 %.

8.2 Построение градуировочной характеристики

Построение и расчет градуировочной характеристики проводят в каждой серии анализов программным обеспечением хромато-масс-спектрометра.

8.2.1 Проводят измерения не менее четырех матричных градуировочных растворов, приготовленных по 6.2.2.5, в порядке возрастания их концентраций. Определяют времена удерживания ион-продуктов аналитов и их внутренних стандартов.

8.2.2 Вычисление площади пика проводят для каждого ион-продукта анализируемых аналитов и их внутренних стандартов. Количественное определение остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов проводят по одному (наиболее интенсивному) ион-продукту.

8.2.3 Градуировочную характеристику строят в координатах «отношение площади пика определяемого соединения к площади пика внутреннего стандарта этого соединения» — «отношение концентраций аналита и внутреннего стандарта». При построении градуировочной характеристики используют линейную регрессию вида $y = a + bx$, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98. Построение градуировочной характеристики проводят при каждой серии измерений заново.

Соответствие аналитов и их внутренних стандартов указано в таблице 1.

8.2.4 Построение линейного градуировочного графика и расчет концентраций аналитов в анализируемых пробах выполняется системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.3 ВЭЖХ-МС/МС измерение

8.3.1 Для измерения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов проводят ВЭЖХ-МС/МС анализ в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования.

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

- подвижную фазу А;

- «чистую» пробу;
- градуировочные растворы (6.2.2.5);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

8.3.3 Определяют и регистрируют на хроматограмме времена удерживания пиков двух ион-продуктов каждого аналита, соответствующие времени удерживания, найденному при измерении градуировочных растворов по 8.1.3.

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 Расчеты остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов и площади пика выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

9.3 Вычисление площади пика проводят по ион-продукту с более интенсивным сигналом для каждого сульфаниламида, нитроимидазола, пенициллина, амфеникола. Отклонения относительных ионных интенсивностей ионов в анализируемой пробе от относительных ионных интенсивностей ионов, полученных при анализе градуировочных растворов, не должны превышать значений, указанных в таблице 4.

Таблица 4 — Допустимые отклонения относительных ионных интенсивностей

Относительная ионная интенсивность, % от основного пика	Максимально допустимое отклонение для ВЭЖХ-МС-МС детектирования, %
Св. 50	±20
Св. 20 до 50 включ.	±25
Св. 10 до 20 включ.	±30
Менее 10 включ.	±50

9.4 Полученные результаты измерений анализируемой пробы округляют:

- в диапазоне значений от 0,20 до 1,00 мкг/кг включительно — до третьего десятичного знака после запятой;
- в диапазоне значений от 1 до 100 мкг/кг включительно — до второго десятичного знака после запятой;
- в диапазоне значений от 100 до 1000 мкг/кг включительно — до первого десятичного знака после запятой.

За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений анализируемой пробы, выраженное в микрограммах на килограмм (мкг/кг), если выполняется условие приемлемости по ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (пункт 5.2.2).

Значения предела повторяемости r и предела воспроизводимости R приведены в таблице 5.

Таблица 5

Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Предел повторяемости r, %, при $P = 0,95$, $n = 2$	Предел воспроизводимости R, %, при $P = 0,95$, $n = 2$
От 0,2 до 1,0 включ.	25	35
Св. 1,0 до 10,0 включ.	20	28
Св. 10,0 до 100,0 включ.	15	22
Св. 100,0 до 1000,0 включ.	10	15

Полученные среднеарифметические значения двух параллельных измерений анализируемой пробы округляют:

- в диапазоне значений от 0,20 до 1,00 мкг/кг включительно — до второго десятичного знака после запятой;
- в диапазоне значений от 1 до 100 мкг/кг включительно — до первого десятичного знака после запятой;
- в диапазоне значений от 100 до 1000 мкг/кг включительно — до целого числа.

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с относительной расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата k = 2 и доверительной вероятности P = 0,95, указанной в таблицах 6 и 7.

Таблица 6

Аналит	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата k = 2 в диапазонах измерений содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов, мкг/кг		
	От 1,0 до 10 включ.	Св. 10 до 100 включ.	Св. 100 до 1000 включ.
Нитроимидазолы			
Диметридазол	64	35	26
Ронидазол	59	33	22
Ипронидазол	67	28	19
Гидроксиипронидазол	58	27	23
Метронидазол	65	27	19
Гидроксиметронидазол	58	31	28
Гидроксиметилметилнитроимидазол	64	36	25
Тернидазол	71	31	26
Тинидазол	73	28	23
Амфениколы			
Флорфеникол	65	29	23
Флорфеникол амин	58	35	27
Тиамфеникол	62	32	23
Сульфаниламиды			
Сульфапиридин	64	34	25
Сульфадиазин	60	40	25
Сульфатиазол	65	38	20
Сульфамеразин	58	46	19
Сульфаметазин	60	47	20
Сульфахлорпиридазин	65	39	18
Сульфахиноксалин	47	35	17

Окончание таблицы 6

Аналит	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата k = 2 в диапазонах измерений содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов, мкг/кг		
	От 1,0 до 10 включ.	Св. 10 до 100 включ.	Св. 100 до 1000 включ.
Сульфаэтоксипиридазин	55	37	16
Сульфагуанидин	98	35	31
Сульфаметоксазол	68	34	19
Сульфаметоксипиридазин	54	46	26
Сульфамоксол	65	36	21
Сульфаниламид	58	46	26
Сульфадиметоксин	67	43	32
Триметоприм	64	38	27
Пенициллины			
Бензилпенициллин	74	46	28
Феноксиметилпенициллин	76	42	25
Ампициллин	72	41	20
Оксациллин	76	37	19
Амоксициллин	79	45	18
Диклоксациллин	73	41	17
Клоксациллин	68	38	19
Нафциллин	69	43	21

Таблица 7

Аналит	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата k = 2 в диапазонах измерений содержания, мкг/кг			
	От 0,2 до 1,0	Св. 1 до 10 включ.	Св. 10 до 100 включ.	Св. 100 до 1000 включ.
Хлорамфеникол	93	81	31	24

Примечание — Значения относительной расширенной неопределенности, указанные в таблицах 6 и 7, соответствуют границам относительной погрешности результатов измерений при P = 0,95.

11 Оформление результатов измерений

Содержание i-го сульфаниламида, нитроимидазола, пенициллина, амфеникола, мкг/кг, представляют в виде

$$\overline{X}_i \pm 0{,}01 \cdot U_i \cdot \overline{X}_i, \text{ при } P = 0{,}95, \quad (3)$$

где $\overline{X}_i$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений содержания i-х сульфаниламида, нитроимидазола, пенициллина, амфеникола в анализируемой пробе, мкг/кг;

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания i-х сульфаниламида, нитроимидазола, пенициллина, амфеникола для соответствующего диапазона измерений, % (в соответствии с таблицами 6 и 7).

12 Контроль стабильности результатов измерений

Контроль стабильности результатов измерений в пределах лаборатории осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (пункт 6.2.3) с использованием контрольных карт Шухарта.

УДК 637:614.3:006.354

МКС 67.050
67.100.10
67.120.10
67.120.20
67.120.30
67.180.10

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, сульфаниламиды, нитроимидазолы, пенициллины, амфениколы, метод определения остаточного содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором

БЗ 6—2019/51

Редактор *Л.И. Нахимова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 16.08.2019. Подписано в печать 04.09.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,90.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru