ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения содержания хлорамфеникола (левомицетина) с помощью жидкостной хроматографии

СТ РК ИСО 13493 – 2007

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

Издание официальное

Комитет по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан (Госстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан на основе собственного аутентичного перевода стандарта ISO, указанного в пункте 3

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом председателя Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан от 03.07.2007 года № 374

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 13493-1998 «Мясо и мясные продукты. Определение содержания хлорамфеникола. Метод жидкостной хроматографии» (ISO 13493:1998 «Meat and meat products - Determination of chloramphenicol content – Method using liquid chromatography»).

Редакционные различия касаются включения в разделы 5 и 6 применяемых материалов и аппаратуры, указанных в стандарте ИСО, а также расширения перечня нормативных ссылок, относящихся к указанным материалам и аппаратуре. Редакция, отличная от ISO 13493:1998, выделена в тексте *курсивом.*

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного стандарта для приведения в соответствие с СТ РК 1.5-2004. Кроме того, в наименование стандарта добавлено в скобках слово (левомицетина), являющегося синонимом названия антибиотика хлорамфеникола, общепринятого в Республике Казахстан.

4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ **2013 год**

ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ **5** лет

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

Содержание

1	Область применения	1
2	Нормативные ссылки	1
3	Термины и определения	2
4	Принцип метода	2
5	Реагенты	2
6	Аппаратура	3
7	Отбор образцов	4
8	Подготовка гомогенизированного образца	4
9	Проведение испытаний	5
10	Обработка результатов измерений	7
11	Прецизионность	7
12	Протокол испытания	8
	Приложение. Библиография	9

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения содержания хлорамфеникола (левомицетина) с помощью жидкостной хроматографии

MEAT AND MEAT PRODUCTS

Method for determination of chloramphenicol content using liquid chromatography

Дата введения 2008.07.01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания хлорамфеникола (левомицетина) в мышечной ткани мяса, включая птицу, с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод ВЭЖХ пригоден для определения хлорамфеникола при его концентрациях в образцах более 6,5 мкг/кг. Данный метод неприменим к испорченным образцам.

Примечание - Настоящий стандарт допускается применять для определения содержания хлорамфеникола во всех видах мяса и мясопродуктов. При этом следует иметь в виду, что материалы, иные, чем мышечная ткань, в межлабораторные испытания метода включены не были.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 25336-82 Е Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний.

ГОСТ 29230-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные.

ГОСТ ИСО 5725-1-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения.

ГОСТ ИСО 5725-2-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.

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

Примечание - Действует до введения в действие СТ РК, разработанного на основе ИСО 3696.

ИСО 17604-2003 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Отбор проб из туш животных для микробиологического анализа.

Издание официальное

Примечание – Международный стандарт ИСО 17604:2003 введен взамен международного стандарта ИСО 3100-1:1991 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

Содержание хлорамфеникола в мясе и мясных продуктах (chloramphenicol content of meat and meat products)**:** Массовая доля хлорамфеникола, измеренная с помощью метода, установленного в настоящем стандарте.

Примечание — Содержание хлорамфеникола выражают в микрограммах на килограмм.

4 Принцип метода

Хлорамфеникол из части гомогенизированного однородного образца, взятой в определенном количестве непосредственно для химического анализа, экстрагируют водой. Для отделения липофильных компонентов от водного раствора применяют фильтрацию и твердофазную экстракцию. Хлорамфеникол элюируют с картриджа (экстракционного патрона) дихлорметаном. Органическую фазу выпаривают и очищают путем жидко-жидкостной экстракции в системе вода-толуол. Содержание хлорамфеникола устанавливают методом обращенно-фазной хроматографии с детектированием в ультрафиолетовой (УФ) области спектра.

5 Реагенты

Применяют только реагенты, предназначенные для аналитических целей, если не указан иной способ действий.

5.1 Вода должна соответствовать требованиям квалификации не ниже 3-й степени чистоты согласно ИСО 3696. Вода должна быть свободной от органических примесей.

5.2 Азот, пригодный для выпаривания растворителей.

5.3 Дихлорметан.

5.4 Толуол.

5.5 Ацетатный буфер, концентрация раствора (CH_3COONa) = 0,01 моль/дм^3, pH = 4,3.

Растворяют 0,82 г безводного натрия ацетата примерно в 970 см^3 воды. С помощью pH-метра (6.1) доводят pH до 4,3 путем добавления 50 % (массовая концентрация) раствора уксусной кислоты (CH_3COOH). Переносят раствор в мерную колбу, вместимостью 1000 см^3. Доводят водой до метки и перемешивают.

5.6 Ацетонитрил, пригодный для ультрафиолетовой спектроскопии.

5.7 Подвижная фаза.

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

Перед применением элюент фильтруют (6.2) через фильтр с размером пор 0,22 мкм и дегазируют.

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

Взвешивают 10 мг хлорамфеникола с точностью 0,1 мг и переносят навеску в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Добавляют метанол (5.10) до метки и перемешивают.

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

5.9 Стандартные растворы хлорамфеникола.

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

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

***5.10** Метанол.*

6 Аппаратура

Используют обычную лабораторную посуду (6.13-6.16) и аппаратуру, в частности:

6.1 pH-метр.

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

6.3 Механическое или электрическое оборудование, пригодное для гомогенизации образца, поступившего в лабораторию на испытание.

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

6.4 Лабораторный блендер (например, типа Стомахер или вихревого типа) [1)].

6.5 Фильтровальная бумага обеззоленная быстрофильтрующая диаметром примерно 15 см.

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

6.6 Экстракционные картриджи (патроны), вместимостью 20 см^3 с диатомитовой землей, позволяющей экстрагировать липофильные компоненты из водных растворов.

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

6.7 Водяная баня или нагревательный блок, позволяющие поддерживать температуру (40 ± 1) °С, и имеющие устройство для сушки азотом (5.2); или ротационный

[1)] Это примеры продукции, доступной на рынке. Данная информация приведена только для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой этой продукции.

вакуумный испаритель.

6.8 Центрифужные пробирки, вместимостью 25 $см^3$.

6.9 Вихревый миксер, с частотой вращения около 700 $мин^{-1}$.

6.10 Центрифуга, обеспечивающая радиальное ускорение около 1000 g.

6.11 Микропипетки, вместимостью 300 $мм^3$.

6.12 Жидкостный хроматограф, оборудованный:

- насосом с постоянной производительностью;

- инжектором;

- обращенно-фазной C_8 или C_{18} колонкой, с внутренним диаметром 3 мм, длиной 20 см, размером частиц 5 мкм, или другой колонкой с эквивалентными характеристиками;

- детектором в ультрафиолетовой и видимой части спектра (УФ/Вид), обеспечивающим измерение при длине волны 285 нм; если возможно, диодно-матричным детектором (в целях подтверждения);

- самописцем с регулируемым диапазоном измерения или интегратором;

6.13 Колбы, емкостью 50, 100, 1000 $см^3$ по ГОСТ 25336.

6.14 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки по ГОСТ 1770.

6.15 Термометры жидкостные стеклянные по ГОСТ 28498.

6.16 Пипетки, градуированные по ГОСТ 29230, 2 класс точности.

7 Отбор образцов

Отбор образцов не является частью метода, изложенного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора образцов приведен в *ИСО 17604.*

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

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

8 Подготовка гомогенизированного образца

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

Гомогенизируют образец с помощью соответствующего оборудования (6.3). При этом необходимо следить за тем, чтобы температура образца в процессе подготовки не превышала 25 °С. При использовании мясорубки, образец пропускают через нее, не менее двух раз.

Приготовленный гомогенизированный образец помещают в герметично закрываемый контейнер. Закрывают и хранят так, чтобы не допустить порчи и изменения его состава.

При необходимости гомогенизированный образец хранят при температуре ниже минус 18 °С.

Анализ образца проводят как можно быстрее, но не позднее, чем через 24 часа после гомогенизации.

9 Проведение испытаний

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

9.1 Общие указания

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

9.2 Навеска

В конической колбе, вместимостью 100 см^3 (6.13) взвешивают 10 г *(m)* гомогенизированного образца (раздел 8) с точностью до 0,1 г.

9.3 Подготовка экстракта

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

Объем (V_1) полученной водной фазы составляет 40,0 см^3 плюс объем воды в навеске (обычно в 10 г навески содержится, около 7,5 см^3 воды)

Экстракт фильтруют через бумажный фильтр (6.5).

9.4 Твердофазная экстракция

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

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

Переносят остаток в центрифужную пробирку (6.8), используя, примерно 10 см^3 дихлорметана (5.3).

Осторожно выпаривают досуха.

9.5 Жидко-жидкостная экстракция

К остатку добавляют 400 мм^3 воды (V_3) и 2,0 см^3 толуола (5.4) и осторожно перемешивают в течение 1 мин с помощью вихревого миксера (6.9) при частоте вращения примерно 700 мин $^{-1}$.

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

Пипеткой отбирают как можно больше органической фазы и отбрасывают её.

Добавляют 1,5 см^3 толуола (5.4) и осторожно перемешивают в течение 1 мин с помощью вихревого миксера (6.9) с частотой вращения примерно 700 мин$^{-1}$.

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

Пипеткой отбирают, как можно больше органической фазы и отбрасывают её.

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

9.6 Хроматографический анализ

9.6.1 Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Длина волны	285 нм
Диапазон шкалы детектора	от 0,005 до 0,01 единиц оптической плотности, что соответствует полной шкале самописца
Шкала самописца	10 мВ
Скорость подачи бумаги самописца	1,0 см/мин
Объемная скорость потока подвижной фазы (5.7)	0,6 см^3/мин
Объем анализируемого раствора, инжектируемый в хроматограф	100 мм^3

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

9.6.2 Процедура хроматографирования

После стабилизации системы жидкостного хроматографа (6.12) инжектируют растворы, полученные из образца, заведомо не содержащего хлорамфеникола («пустого» образца»); «пустого образца со специально внесенным хлорамфениколом»; четырех стандартных растворов хлорамфеникола (5.9); раствора, приготовленного из испытуемого образца (9.5); и снова из стандартных растворов хлорамфеникола (5.9).

На хроматограммах образцов проверяют наличие сигналов на участках, соответствующих времени удерживания хлорамфеникола.

9.6.3 Измерение

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

Характеристики, полученные для стандартных растворов хлорамфеникола, должны продемонстрировать линейную зависимость от концентраций хлорамфеникола в этих растворах.

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

10 Обработка результатов измерений

Содержание хлорамфеникола в гомогенизированном испытуемом образце рассчитывают по формуле:

$$\omega = \frac{h \times \rho \times V_1 \times V_3}{h_s \times m \times V_2}, \quad (1),$$

где ω - содержание хлорамфеникола, в микрограммах на килограмм, гомогенизированного испытуемого образца;

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

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

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

m - масса испытуемой пробы (9.2), г;

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

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

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

Результат вычислений округляют до 0,1 мкг/кг.

Результат испытаний нельзя корректировать на аналитическую открываемость. Аналитическая открываемость должна быть указана в протоколе испытаний (раздел 12).

11 Прецизионность *(по ГОСТ ИСО 5725-1 и ГОСТ ИСО 5725-2)*

11.1 Межлабораторные испытания

Прецизионность метода была установлена в процессе межлабораторных испытаний, выполненных в соответствии с ISO 5725 [1].

Результаты этих межлабораторных испытаний были опубликованы [2]. Эти результаты не могут быть распространены на области концентраций и на матрицы *(фон)*, отличающиеся от указанных в настоящем стандарте.

Результаты других межлабораторных испытаний, приведенных в соответствии с ISO 5725, показывают, что аналитическая открываемость для мяса, мяса птицы и мясных продуктов воспроизводима и равна, примерно 55 %.

11.2 Повторяемость

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

11.3 Воспроизводимость

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

12 Протокол испытания

В протоколе испытания необходимо указать:

- информацию, необходимую для полной идентификации образца;

- использованный метод отбора образцов (если известен);

- использованный метод испытаний с указанием ссылки на настоящий стандарт;

- условия проведения испытаний, не отраженные в настоящем стандарте или считающиеся неоднозначными, а также все имевшие место случаи, которые могут повлиять на результаты испытаний;

- полученный результат испытаний или два результата испытаний, если проводилась проверка повторяемости;

- аналитическая открываемость.

Приложение

(справочное)

Библиография

[1] ISO 5725:1986 Precision of test methods. Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.

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

УДК 637.544:006.354 **МКС 67.120.10**

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

Басуға _____ж. қол қойылды Пішімі 60х84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,
«Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана. Тапсырыс ____

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы
Есіл өзенінің сол жақ жағалауы, Орынбор көшесі, 11 үй,
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8 (7172) 240074

gost.e-ecolog.ru