**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

# ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ (ЛЕВОМЕЦИТИН, ТЕТРАЦИКЛИНОВАЯ ГРУППА)

**СТ РК 1505–2006**

**Издание официальное**

**Комитет по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан**

**Астана**

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

**1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета по техническому регулированию Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан, ТОО «Иртыш-Стандарт»

**2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Приказом Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан 20 июля 2006 г. № 307

**3** Положения настоящего стандарта соответствуют основным требованиям методик Внедренческой научно-производственной фирмы «ЮМХ», Россия, № 08-47/106, 08-47/111, 08-47/087 и гармонизирован со стандартами Кодекс Алиментариус GLP.

**4** В настоящем стандарте реализованы нормы Законов Республики Казахстан «О техническом регулировании», «О качестве и безопасности пищевых продуктов», «О защите прав потребителей», «О языках в Республике Казахстан».

**4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ** 2011 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 Отбор проб 2

4 Метод определения 2

5 Требования к выполнению аналитических измерений 3

6 Аппаратура, материалы и реактивы 3

7 Условия выполнения измерений 4

8 Подготовка к выполнению измерений 4

9 Подготовка проб 7

10 Выполнение измерений 9

11 Вычисление и оформление результатов анализа 10

12 Контроль точности результатов анализа 12

Приложение А. Результаты межлабораторных испытаний 14

Приложение Б. Библиография 15

# ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
## Определение антибиотиков методом инверсионной вольтамперометрии (левомицетин, тетрациклиновая группа)

**Дата введения 2007.07.01**

### 1 Область применения

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

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

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

### 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ Р 8.563-96 Методики выполнения измерений.

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

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

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

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

ГОСТ 427-75 Линейки измерительные металлические. Технические условия

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

ГОСТ 2156-76 Натрий углекислый. Технические условия.

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

ГОСТ 3118-77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия.

ГОСТ 3769-78 Реактивы. Аммоний сернокислый. Технические условия.

ГОСТ ИСО 5725-2003 (часть 1-6) Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

ГОСТ 5381-93 (ИСО 5019-1-84, ИСО 5019-2-84, ИСО 5019-5-84) Изделия высокоогнеупорные хромитопериклазовые. Технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

**Издание официальное**

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

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

ГОСТ 9293-74 (ИСО 2435-73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия.

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

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 14261-77 Кислота соляная концентрированная . Технические условия.

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

ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия.

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

ГОСТ 22280-76. Натрий лимоннокислый. Технические условия.

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

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

ГОСТ 26809-86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу.

ГОСТ 27583-88. Яйца куриные пищевые. Технические условия.

ГОСТ 29225-91(ИСО 1775-75) Посуда и оборудование фарфоровые лабораторные. Общие требования и методы испытаний.

ГОСТ 29227-91 (ИСО 8 35-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

## 3 Отбор проб

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

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

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

3.4 Пробы хранят в холодильнике при температуре (2–5) $^0$С в сосудах из химического стекла под темным колпаком.

## 4 Метод определения

### 4.1 Сущность метода

Сущность метода состоит в переводе левомицетина и тетрациклина из пробы в раствор, кислотном гидролизе и осаждения белка из гидролизата с последующим дифференциально-вольтамперометрическим (ВА) определением антибиотиков: левомицетина ($C\ H\ _2N_2O_3$), тетрациклина (ахромицин, гостациклин, тетрациклин $C_{22}H_{24}N_2O_8$).

Метод измерения основан на способности восстанавливаться на индикаторном ртутно-пленочном электроде в фоновом электролите 0,10 моль/дм$^3$ $(NH_4)_2SO_4$, в области

потенциалов от -0 45 В до -0,95 В для левомицетина, окисляться на индикаторном стеклоуглеродном электроде в фоновом электролите 0,1 моль/дм$^3$ раствора цитрата натрия ($Na_3Cit$) в области потенциалов от +0,65 В до 0,85 В для тетрациклина. Содержание антибиотиков определяют по высоте пика, регистрируемого при потенциале левомицетина - (-0,65±0,05) В, при потенциале тетрациклина – (+075 ± 0,05) В относительно хлорсеребряного электрода в дифференциальном режиме съемки вольтамперограмм. Массовую концентрацию антибиотиков в пробе определяют методом добавок аттестованных смесей левомицетина и тетрациклина. В качестве рабочих стандартных образцов используют серийное лекарственное вещество левомицетин и тетрациклин гидрохлорид, соответствующие требованиям [2], [3].

## 5 Требования к выполнению аналитических измерений

### 5.1 Условия безопасного проведения работ

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

5.1.2 Электробезопасность при работе с электроустановками – по ГОСТ 12 1.019.

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

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

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

### 5.2 Требования к квалификации операторов

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

## 6 Аппаратура, материалы и реактивы

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

6.1 Средства измерений и вспомогательное оборудование

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

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

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

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

Электрохимическая ячейка или электрохимический датчик в состав которых входят:

электроды:

- индикаторный - ртутно-пленочный электрод (РЭП) с рабочей поверхностью (15-20) мм$^2$;
- индикаторный – стеклоуглеродный электрод (СУЭ) с рабочей поверхностью (80-120) мм$^2$;

- сравнения-хлорсеребряный электрод (ХСЭ) с сопротивлением не более 3,0 кОм.

сменные стаканчики из кварцевого стекла вместимостью (15,0- 25, 0) м$^3$;

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

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

Весы лабораторные аналитические общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, 2-го класса точности по ГОСТ 24104;

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

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

Баня водяная;

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

Шланги полиэтиленовые для подвода газа к ячейке;

Линейка измерительная по ГОСТ 427;

Холодильник электрический;

Центрифуга лабораторная марки Опн-8;

Посуда и оборудование фарфоровые лабораторные по ГОСТ 29225;

Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные по ГОСТ 29227.

6.2 Посуда

Пипетки мерные лабораторные стеклянные 2-го класса точности вместимостью 0,50; 1,00; 2,00; 5,00, 10,0 см по ГОСТ 29227.

Посуда и оборудование лабораторные стеклянные по ГОСТ 25336 или посуда мерная лабораторная стеклянная 2-го класса точности по ГОСТ 1770, колбы наливные вместимостью 25,0; 50,0, 100,0; 1000 см$^3$, цилиндры вместимостью 10,0;-25,0 см', пробирки мерные вместимостью 10,0; 15,0 см$^3$.

Кварцевые стаканчики вместимостью (15,0 –25,0) см$^3$.

Пробирки для центрифугирования из стекла или пластмассовые вместимостью (10,0 - 20,0) см$^3$.

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

6.3 Реактивы и материалы

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

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

Спирт этиловый высшей очистки по ГОСТ 18300.

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

Калий хлористый по действующим нормативным документам.

Аммоний сернокислый по ГОСТ 3769.

Натрий лимоннокислый по ГОСТ 22280.

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

Вода бидистиллированная по действующим нормативным документам или дистиллированная по ГОСТ 6709, перегнанная в присутствии серной кислоты (0,5 см$^3$ концентрированной серной кислоты на 1,0 дм$^3$ дистиллированной воды и 3,0 см$^3$ 3%-ного раствора перманганата натрия).

Бумага индикаторная универсальная (pH 1÷ 14).

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

Бумага масштабно-координатная.

Все реактивы должны быть квалификации ОСЧ (особой чистоты) или ХЧ (химически чистые).

## 7 Условия выполнения измерений

7.1 При выполнении анализов должны соблюдаться следующие внешние условия:

- температура окружающего воздуха (25±10) $^0$ С;
- атмосферное давление (760±60) мм ртутного столба или (97±10) кПа;
- относительная влажность (65±15) %;
- частота переменного тока (50±5) Гц;
- напряжение сети (220±10) В.

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

## 8 Подготовка к выполнению измерений

### 8.1 Подготовка приборов к работе

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

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

- двухэлектродная система измерений;
- постоянноточковый режим регистрации вольтамперограмм с последующим дифференцированием;
- катодная развертка потенциала.

Таблица 1- **Рекомендуемый режим работы полярографа ПУ-1**

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

**8.2 Подготовка лабораторной посуды**

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

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

Посуда считается чистой, когда получают аналитические сигналы органического соединения в фоновом электролите, равные или близкие к нулю (не более 2 мм, при чувствительности прибора 5 - $10^{-10}$ А/мм).

**8.3 Приготовление и проверка работы электродов**

8.3.1 Подготовка индикаторного ртутно-пленочного электрода

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

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

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

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

После проведения анализа СУЭ хранить в сухом виде.

8.3.2 Подготовка к работе электрода сравнения.

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

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

**8.4 Приготовление растворов**

8.4.1 Приготовление фонового электролита

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

Фоновым раствором электролита для тетрациклина служит раствор 0,10 $моль/дм^3$ натрия лимоннокислого.

8.4.2 Приготовление основного раствора левомицетина

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

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

Основной раствор левомицетина концентрации 1000,0 мг/дм$^3$ устойчив в течение трех месяцев.

8.4.3 Приготовление основного раствора тетрациклина

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

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

Основной раствор тетрациклина концентрации 1000,0 мг/дм$^3$ устойчив в течение трех месяцев.

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

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

| Концентрация исходного раствора для приготовления АС, мг/дм$^3$ | Отбираемый объем, см$^3$ | Объем мерной посуды, см$^3$ | Концентрация приготовленного раствора АС, мг/дм$^3$ | Код полученного (АС) раствора антибиотика |
|---|---|---|---|---|
| 1000,0 | 2,50 | 25,0 | 100,0 | АС-1 |
| 100,0 | 2,50 | 25,0 | 10,0 | АС-2 |
| 10,0 | 12,50 | 25,0 | 5,0 | АС-3 |
| 10,0 | 5,00 | 25,0 | 2.0 | АС-4 |
| 2,0 | 2,50 | 10,0 | 0,5 | АС-5 |

АС-1 устойчив в течение 30 дней при хранении под темным колпаком в холодильнике при температуре (2 –5) $^0$С;

АС-2 устойчив в течение 7 дней при хранении под темным колпаком в холодильнике при температуре (2–5)$^0$С;

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

При наличие ГСО растворов определяемого вещества основные растворы готовят из соответствующего ГСО по инструкции по приготовлению раствора.

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

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

8.4.5. Приготовление раствора соляной кислоты

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

Соляную кислоту (марки ХЧ) перегоняют. Перегнанная, при температуре 20 $^0$С, соляная кислота должна быть концентрации не менее 6,0 моль/дм$^3$.

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

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

## 9 Подготовка проб

### 9.1. Подготовка молока или молочного продукта (для определения левомицетина)

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

Центрифугат сливают в коническую колбу, помещают на водяную баню с температурой (35±5 $^0$С) и добавляют (5–6) г аммония сернокислого порциями по (2–3) г, каждый раз перемешивая содержимое колбы стеклянной палочкой до растворения соли.

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

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

Полученный фильтрат является подготовленной пробой.

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

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

В коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ вносят 25,00 г молока или молочного продукта, взвешенного с точностью до 0,01 г, добавляют 15,0 $см^3$ бидистиллированной воды и 0,5 $см^3$ концентрированной соляной кислоты. Смесь энергично встряхивают в течении 5 минут. Затем к смеси добавляют (1,5-2,0) г аммония сернокислого $(NH_4)_2SO_4$ и 1,0 $см^3$ цинка уксуснокислого концентрации 300,0 г/$дм^3$, к полученной смеси прибавляют несколькими порциями (0,5-1,0) г натрия углекислого кислого (гидрокарбоната) до pH (6,0-6,5), контролируя pH раствора по индикаторной бумаге.

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

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

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

### 9.3. Подготовка проб мяса и субпродуктов.

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

Затем центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр в коническую колбу

вместимостью 100 $см^3$. Затем в колбу с фильтратом добавляют (3,0-5,0) г аммония сернокислого. Содержимое колбы встряхивают в течении (5-10) мин.

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

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

**9.4. Подготовка проб яиц.**

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

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

Затем центрифугат отфильтровывают через бумажный фильтр в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$. Затем в колбу с фильтратом добавляют (3,0-5,0) г аммония сернокислого. Содержимое колбы встряхивают в течении (5-10) мин.

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

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

**10 Выполнение измерений**

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

**10.1 Проверка стаканчиков, фонового раствора и электрода на чистоту**

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

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

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

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

10 1.5 По окончании электролиза отключают газ и через 5 с начинают регистрацию вольтамперограммы в диапазоне потенциалов от -0,45 до -0,95 В или в диапазоне от +0,20В до +1,00В. Потенциал катодного пика левомицетина находится в диапазоне от (-0,65+0,05) В, а тетрациклина в диапазоне от (+0,75±0,05) В.

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

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

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

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

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

**10.2. Анализ пробы**

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

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

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

10.2.3 Повторяют последовательно операции согласно 10.1.2-10 1.6.

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

10.2.5 Операции согласно 10.1.4- 10.1.6 повторяют три раза.

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

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

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

Т а б л и ц а 3 – **Рекомендуемые добавки аттестованных смесей**

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг | 0,006…0,05 | 0,5…0,100 | 3,0…15,0 | 10,0…30,0 |
| Время электролиза, с | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Концентрация АС для добавок, мг/$дм^3$ | 0,5 | 10 | 0,5 или 2,0 | 2,0 или 5,0 |
| Рекомендуемый объем добавки АС, $см^3$ | 0,02…0,20 | 0,02…0,050 | 0,03....0,04 | 0,02....0,03 |
| Чувствительность прибора, А/мм | $5 * 10^{-10}$ | $1 * 10^{-9}$ | $5 * 10^{-10}$ | $1 * 10^{-9}$ |

10.2.9 Проводят электронакопление и регистрацию вольтамперограмм по 10.1.4- 10.1.6 три раза.

10.2.10 Измеряют высоты катодных, анодных пиков антибиотиков в пробе с добавкой АС.

10.2.11 Выливают содержимое стаканчика в сосуд для слива.

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

10.2.13 Операции согласно п. 10.2.1-10.2.12 проводят для каждой из параллельных анализируемых проб в одинаковых условиях.

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

Таблица 4 – **Рекомендуемая форма записи результатов измерений при анализе проб**

| Определяемое вещество | Анализируемая проба (характеристика, номер, дата.) | Условия измерений (чувствительность; время электролиза; объем аликвоты) | Высота пика вещества в пробе, мм, или ток, А | Добавка АС: Vд $См^3$, $С_{доб}$ $мг/дм^3$ | Высота пика вещества после добавки АС, мм, или ток, А |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |

## 11 Вычисление и оформление результатов анализа

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

### 11.1 Расчет величин максимальных катодных, анодных токов

11.1.1 Для определяемого компонента рассчитывают среднее из трех значений высот пиков, полученных при 3-х кратной регистрации вольтамперограммы пробы, не учитывая первую вольтамперограмму.

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

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

где:

$I_i$ - величина максимального катодного или анодного тока данного вещества в данной пробе, А;

$h_i$ – средняя высота пика вещества в пробе, мм;

$\alpha$ - чувствительность прибора при регистрации данного пика, А/мм.

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

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

**11.2 Расчет содержания вещества в пробе**

11.2.1 Расчет содержания антибиотиков в анализируемой пробе проводят по формуле:

$$X' = \frac{I_i \, C_д \, V_д \, V_ф \, 1000}{(I_2 - I_1) \, m \, V_{ал}} \qquad (2)$$

где:

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

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

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

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

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

m - масса анализируемого продукта, г;

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

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

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

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

Таблица 5 - **Рекомендуемая форма записи результатов анализа проб**

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

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

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

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое двух параллельных определений с тем же числом значащих цифр.

Если расхождение между результатами параллельных определений не превышает $| X' - X'' | \leq 0{,}01dX$, где X", X' и X – результаты параллельных определений и их среднее

арифметическое, а d – норматив контроля сходимости, то среднее арифметическое X принимают за результат анализа. В противном случае анализ повторяют. Значение норматива d приведено в таблице 5.

По полученному результату анализа X и значению относительной погрешности δ, приведенной в таблице 5, рассчитывают абсолютную погрешность $\Delta = 0{,}01\ \delta\ X$.

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

## 12 Контроль точности результатов анализа

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

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

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

Воспроизводимость контрольных анализов признают удовлетворительной, если $|X' - X''| \leq 0{,}01\ DX$, где X", X' и X– результаты анализа одной и той же пробы, полученные в разных лабораториях или при варьирующих условиях в одной лаборатории и их среднее арифметическое значение, D – значение норматива внутреннего оперативного контроля воспроизводимости. Значение норматива D приведено в таблице 5.

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

Т а б л и ц а 6 – **Диапазон измерений, значение характеристики относительной погрешности и нормативы оперативного контроля случайной составляющей относительной погрешности (сходимости и воспроизводимости) при доверительной вероятности P = 0,95**

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

12.3 Для проведения контроля точности используют рабочие пробы с известной добавкой хлоридов. В качестве добавки антибиотиков используют государственные стандартные образцы или аттестованные смеси. Пробу делят на две равные части, первую из которых анализируют в соответствии с настоящим стандартом, а во вторую вводят

известную добавку хлоридов и затем также анализируют в соответствии с настоящим стандартом. Величина добавки должна составлять (50 – 150) % содержания антибиотиков в анализируемой пробе.

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

Норматив оперативного контроля точности рассчитывают по формулам: при проведении внутрилабораторного контроля (Р = 0,90)

$$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta X_1)^2 + (\Delta X)^2} \qquad (4)$$

при проведении внешнего контроля (Р = 0,95)

$$K = \sqrt{(\Delta X_1)^2 + (\Delta X)^2} \qquad (5)$$

где $\Delta_{X1} + \Delta_X$ – значения характеристики погрешности, соответствующие массовой концентрации левомицетина и тетрациклина в пробе с добавкой стандартных растворов и в реальной пробе;

$\Delta_{X1} = 0{,}01\ \delta X_1 \times X_1$ и $\Delta_X = 0{,}01\ \delta X \times X$, где $X_1$ и X – массовая концентрация антибиотиков в пробе с добавкой и в реальной пробе, мг/кг или %;

Значения относительной погрешности δ приведены в таблице 6.

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

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

Результаты ВОК заносят в специальный журнал.

**Приложение А**
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Межлабораторные испытания выполнены в трех испытательных лабораториях, каждая из которых выполнила определение антибиотиков 5-кратным повторением. Статистические результаты определены в соответствии с ГОСТ ИСО 5725 и приведены в таблице А1.

Таблица А1 – **Статистические результаты оценки межлабораторных сличительных испытаний по определению антибиотиков в мясе.**

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

**Приложение**
(справочное)

Библиография

[1] СанПиН 4.01.071.03. Санитарные правила и нормы и гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.
[2] ВФС 42991-2003 Фармакопейная статья.
[3] ВФС 609-2002 Фармакопейная статья.

**УДК 663/.664:543.06:006.354** **МКС 67.120.01**

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

*Для заметок*

gost.e-ecolog.ru