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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34136— 2017

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2018

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 августа 2017 г. № 102-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 сентября 2017 г. № 1160-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34136—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2018 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2018 г.

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2017, 2018

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

МКС 67.050, 67.100, 67.120.10, 67.120.20, 67.120.30

Поправка к ГОСТ 34136—2017 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 5.1, первое перечисление	максимальной нагрузкой не более 150 г и пределами допускаемой погрешности не более ± 0,001 г;	пределами допускаемой погрешности не более ± 0,03 г;
второе перечисление	- весы высокого (II) класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,02 мг;	- весы специального (I) класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,2 мг;

(ИУС № 2 2020 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Food products, food raw materials.
Method for determination of the residual content of macrolides, lincosamides and pleuromutilins by high performance liquid chromatography — mass spectrometry

Дата введения — 2018—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и продовольственное сырье: мясо (все виды животных), в том числе мясо птицы, субпродукты, мясные продукты, полуфабрикаты, рыбу, креветки, молоко, молочные продукты, в том числе сыр, и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (далее — ВЭЖХ-МС/МС) для определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов.

Диапазон измерений для макролидов в мясе, мясных продуктах и полуфабрикатах, рыбе, креветках, молоке, молочных продуктах, в том числе сыре, — от 1 до 320 мкг/кг, в субпродуктах — от 1 до 3200 мкг/кг; для линкозамидов в мясе, мясных продуктах и полуфабрикатах, рыбе, креветках — от 1 до 160 мкг/кг, в молоке, молочных продуктах, в том числе сыре, — от 1 до 240 мкг/кг, в субпродуктах — от 10 до 2400 мкг/кг; для плевромутилинов — в мясе, мясных продуктах и полуфабрикатах, рыбе, креветках, молоке, молочных продуктах, в том числе сыре, — от 1 до 160 мкг/кг, в субпродуктах — от 5 до 1600 мкг/кг.

Примечания

1 Макролиды: спирамицин, эритромицин, кларитромицин, тулатромицин, тилмикозин, тилозин, тилвалозин.

2 Линкозамиды: линкомицин, клиндамицин, пирлимицин.

3 Плевромутилины: валнемулин, тиамулин.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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 12.2.085—2002 Сосуды, работающие под давлением. Клапаны предохранительные. Требования безопасности

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

Издание официальное

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

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

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

ГОСТ 5848—73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995—77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 7269—2015 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

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 22300—76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

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

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

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31339—2006 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. 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 макролидов, линкозамидов и плевромутилинов из анализируемой пробы, их идентификации и количественном определении методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (ММР). Количественное определение проводят методом внутреннего стандарта.

4 Требования безопасности и условия выполнения измерений

4.1 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.

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

4.3 Приготовление градуировочных растворов проводят в вытяжном шкафу.

4.4 При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила по электробезопасности по ГОСТ 12.1.019 и правила безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением по ГОСТ 12.2.085.

4.5 Применяемые при определении остаточных содержаний макролидов, линкозамидов, плевромутилинов средства измерений должны иметь свидетельства о поверке, вспомогательное оборудова-

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

ние — свидетельства об аттестации, оформленные в соответствии с требованиями национального законодательства в области обеспечения единства измерений, действующего на территории государства, принявшего стандарт.

4.6 К выполнению измерений методом ВЭЖХ-МС/МС допускаются лица, владеющие техникой ВЭЖХ-МС/МС и изучившие инструкции по эксплуатации применяемого оборудования.

4.7 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... от 15 °С до 30 °С;
- относительная влажность воздуха ..... от 20 % до 80 %.

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

5.1 Для определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов 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 погрешности не более ± 0,001 г;
- весы высокого (II) класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,02 мг;
- масс-спектрометр, оснащенный источником ионизации с электрораспылением, квадрупольными анализаторами, с диапазоном измерений от 100 до 1100 атомных единиц массы (а. е. м.), массовым разрешением не менее 0,7 а. е. м., с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,1 а. е. м., с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС);
- систему высокоэффективной жидкостной хроматографии, оснащенную бинарным насосом со смесителем, термостатом хроматографической колонки, обеспечивающим температуру нагрева до (50 ± 1) °С;
- колонку хроматографическую, заполненную обращенно-фазным сорбентом С18 размером частиц не более 5,0 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;
- модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и максимальной температурой термостатирования 60 °С;
- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;
- картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 $см^3$, заполненные обращенно-фазным сорбентом с диаметром частиц сорбента от 20 до 50 мкм;
- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 $дм^3$;
- встряхиватель (шейкер) вибрационный для пробирок орбитального типа движения с амплитудой встряхивания 3 мм, диапазоном скоростей от 150 до 2000 об/мин;
- генератор азота, с объемной долей азота не менее 90 % и производительностью 200 $дм^3$/мин;
- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;
- камеру лабораторную морозильную с рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С;
- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением 18 МОм·см;
- холодильник бытовой с рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 4000 об/мин и диапазоном температур от 4 °С до 20 °С с адаптерами для пробирок вместимостью 15 $см^3$;
- центрифугу лабораторную с центробежным ускорением не менее 15000 об/мин и с адаптерами для пробирок вместимостью 1,5 $см^3$;
- шкаф сушильный с максимальной температурой нагрева не менее 200 °С и погрешностью поддержания заданной температуры ± 5 °С;
- пробы, не содержащие макролиды, линкозамиды и плевромутилины, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, в зависимости от типа исследуемой матрицы («чистые» пробы*);
- фильтры нейлоновые мембранные с размером пор 0,2 мкм;

---

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

- пробирки микроцентрифужные полипропиленовые вместимостью 1,5 $см^3$;
- виалы (флаконы) для автоматического устройства ввода проб вместимостью 2 $см^3$ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм;
- виалы (флаконы) полипропиленовые или пробирки полипропиленовые вместимостью 15 и 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками;
- колбы 1—25(1000)—2 по ГОСТ 1770;
- пипетки 2—2—1—2(5,10) по ГОСТ 29227;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 5—25, 20—100, 200—1000 $мм^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %;
- пробирки П—2—10—14/23ХС по ГОСТ 1770;
- цилиндры 1—25(1000)—1 по ГОСТ 1770.

5.2 При определении содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов применяют следующие реактивы:

- азот газообразный марки 60 по ГОСТ 9293, ос. ч.;
- ацетон по ГОСТ 2603;
- ацетонитрил для ВЭЖХ с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709;
- кислоту муравьиную по ГОСТ 5848, ч. д. а.;
- метанол по ГОСТ 6995, х. ч.;
- эфир этиловый уксусной кислоты (этилацетат) по ГОСТ 22300, ч. д. а.

5.3 При определении содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов в качестве образцов сравнения применяют соединения с массовой долей основного вещества не менее 85 %.

5.3.1 Для приготовления исходных растворов:

- спирамицин;
- эритромицин;
- кларитромицин;
- тулатромицин;
- тилмикозин;
- тилозин;
- тилвалозин;
- линкомицин;
- клиндамицин;
- пирлимицин;
- валнемулин;
- тиамулин.

5.3.2 Для приготовления исходных растворов внутренних стандартов:

- рокситромицин-Д7;
- азитромицин-Д3;
- клиндамицин-Д3;
- валнемулин-Д6.

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 последовательной промывкой органическими растворителями: этилацетатом (однократно), ацетоном (дважды).

6.1.3 Процедуру промывки органическими растворителями 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 подвижной фазы А

Для приготовления подвижной фазы А в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 300 см^3 деионизированной воды и 5 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора деионизированной водой до метки на колбе.

Срок хранения раствора при температуре от 15 °С до 25 °С — не более 2 мес.

6.3 Приготовление градуировочных растворов

6.3.1 Приготовление исходных стандартных растворов макролидов, линкозамидов, плевромутилинов (растворы C_0) массовыми концентрациями 200 мкг/см^3

Для приготовления исходных растворов C_0 с массовой концентрацией 200 мкг/см^3 рассчитывают необходимую массу *i*-го вещества, мг, с учетом содержания основного вещества для каждого определяемого аналита по формуле

$$m_i = C \cdot V \cdot \frac{100}{P_i} \cdot \frac{M_i}{M_{\text{аналита } i}} \cdot 0{,}001, \quad (1)$$

где C — концентрация *i*-го аналита в стандартном растворе, мкг/см^3;

V — объем мерной колбы, см^3;

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.

В мерные колбы вместимостью 25 см^3 по отдельности вносят рассчитанные массы исходных веществ (взвешивание проводят с точностью до первого десятичного знака). Приливают по 15 см^3 метанола, перемешивают и после полного растворения сухого вещества доводят объем растворов метанолом до метки на колбе. Помещают в ультразвуковую баню на 5 мин в режиме перемешивания.

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

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.2 Приготовление рабочих стандартных растворов макролидов, линкозамидов, плевромутилинов массовыми концентрациями 10 мкг/см^3 (раствор C_1), 1 мкг/см^3 (раствор C_2), 0,1 мкг/см^3 (раствор C_3)

Рабочие растворы C_1, C_2, C_3 готовят в мерных пробирках вместимостью 10 см^3 в соответствии с рисунком 1.



Рисунок 1 — Приготовление рабочих растворов C_1, C_2, C_3

Растворы C_1, C_2, C_3 хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С.

Срок хранения раствора C_1 — не более 6 мес, C_2 — не более 3 мес, C_3 — не более одной недели.

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.3 Приготовление исходных растворов внутренних стандартов макролидов, линкозамидов, плевромутилинов массовыми концентрациями 200 мкг/см^3 (растворы D_0)

6.3.3.1 Внутренние стандарты для макролидов, линкозамидов, плевромутилинов выбирают в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Соответствие между аналитами и внутренними стандартами

Наименование аналита	Наименование внутреннего стандарта
Спирамицин Тулатромицин Тилмикозин	Азитромицин-Д3
Эритромицин Кларитромицин Тилвалозин Тилозин	Рокситромицин-Д7
Линкомицин Клиндамицин Пирлимицин	Клиндамицин-Д3
Валнемулин Тиамулин	Валнемулин-Д6

6.3.3.2 Для приготовления исходных растворов D_0 массовой концентрацией 200 мкг/см^3 рассчитывают необходимую массу *i*-го вещества, мг (взвешивание проводят с точностью до первого десятичного знака), с учетом содержания основного вещества во внутреннем стандарте по формуле 1.

В мерные колбы вместимостью 25 см^3 по отдельности вносят рассчитанные массы исходных веществ, приливают по 15 см^3 метанола, перемешивают до полного растворения сухого вещества. Доводят объем растворов метанолом до метки на колбе, затем помещают в ультразвуковую баню на 5 мин.

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

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.4 Приготовление рабочих растворов внутренних стандартов массовыми концентрациями 2 мкг/см^3 (раствор D_1) и 1 мкг/см^3 (раствор D_2) каждого внутреннего стандарта

Рабочие растворы внутренних стандартов D_1, D_2 готовят в мерных пробирках вместимостью 10 см^3 в соответствии с рисунком 2.

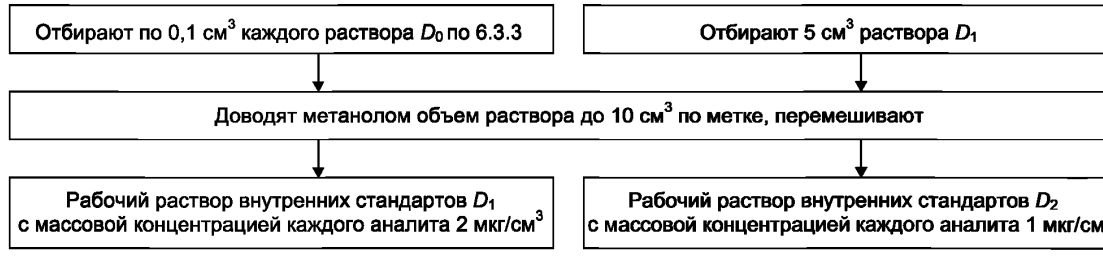

Рисунок 2 — Приготовление рабочих растворов внутренних стандартов D_1, D_2

Растворы D_1, D_2 хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С.

Срок хранения раствора D_1 — не более 6 мес, D_2 — не более 3 мес.

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.5 Приготовление матричных градуировочных растворов (растворы G_1—G_8)

Матричные градуировочные растворы G_1—G_8 готовят в виалах или полипропиленовых пробирках вместимостью 15 см^3 из «чистых» проб массой 1,0 г, в которые вносят рабочий раствор внутренних стандартов D_2 и рабочие растворы определяемых аналитов C_1, C_2, C_3 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	D_2
G_1 (3200 нг/см^3)	0,32	—	—	0,05
G_2 (1000 нг/см^3)	0,1	—	—	0,05
G_3 (500 нг/см^3)	0,05	—	—	0,05
G_4 (100 нг/см^3)	—	0,1	—	0,05
G_5 (50 нг/см^3)	—	0,05	—	0,05
G_6 (10 нг/см^3)	—	—	0,1	0,05
G_7 (5 нг/см^3)	—	—	0,05	0,05
G_8 (1 нг/см^3)	—	—	0,01	0,05

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

Растворы G_1—G_8 используют свежеприготовленными.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб мяса, печени — по ГОСТ 7269.

7.1.2 Отбор проб мяса и печени птицы — по ГОСТ 31467.

7.1.3 Отбор проб мясных продуктов — по ГОСТ 4288, ГОСТ 9792.

7.1.4 Отбор проб рыбы, креветок — по ГОСТ 31339.

7.1.5 Отбор проб молока и молочных продуктов по ГОСТ 26809.1, сыра — по ГОСТ 26809.2.

7.1.6 Отобранные пробы по 7.1.1, 7.1.2, 7.1.4 при отсутствии возможности анализа в день отбора замораживают и хранят при температуре от минус 15 °С до 25 °С до проведения анализа.

7.2 Подготовка проб

Подготовку проб молока и молочных продуктов проводят по ГОСТ 26809.1, сыра — по ГОСТ 26809.2. Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. Рыбу предварительно очищают от крупных костей и кожи, креветки — от хитина и других нецелевых составляющих. Мясо, субпродукты, мясные продукты, рыбу, креветки измельчают на гомогенизаторе. Обработку проб проводят в соответствии с рисунком 3.

7.3 Очистка подготовленных проб методом ТФЭ

Картриджи для твердофазной экстракции предварительно кондиционируют, последовательно пропуская 2 см^3 метанола и 2 см^3 деионизированной воды (вакуум или избыточное давление не применяют). Затем пропускают через картридж пробу, полученную в соответствии с 7.2. Промывают картридж 2 см^3 деионизированной воды и сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 10 мин. Элюируют определяемые вещества в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см^3 с помощью 3 см^3 метанола. Упаривают элюат до 0,1—0,2 см^3 в токе азота при температуре не более 40 °С, добавляют 0,5 см^3 подвижной фазы А (см. 6.2), перемешивают и переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 см^3. Доводят объем раствора до 1,0 см^3 подвижной фазой А, центрифугируют при 15000 об/мин и температуре 4 °С в течение 10 мин. Затем фильтруют через мембранный фильтр в виалу вместимостью 2 см^3 и используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

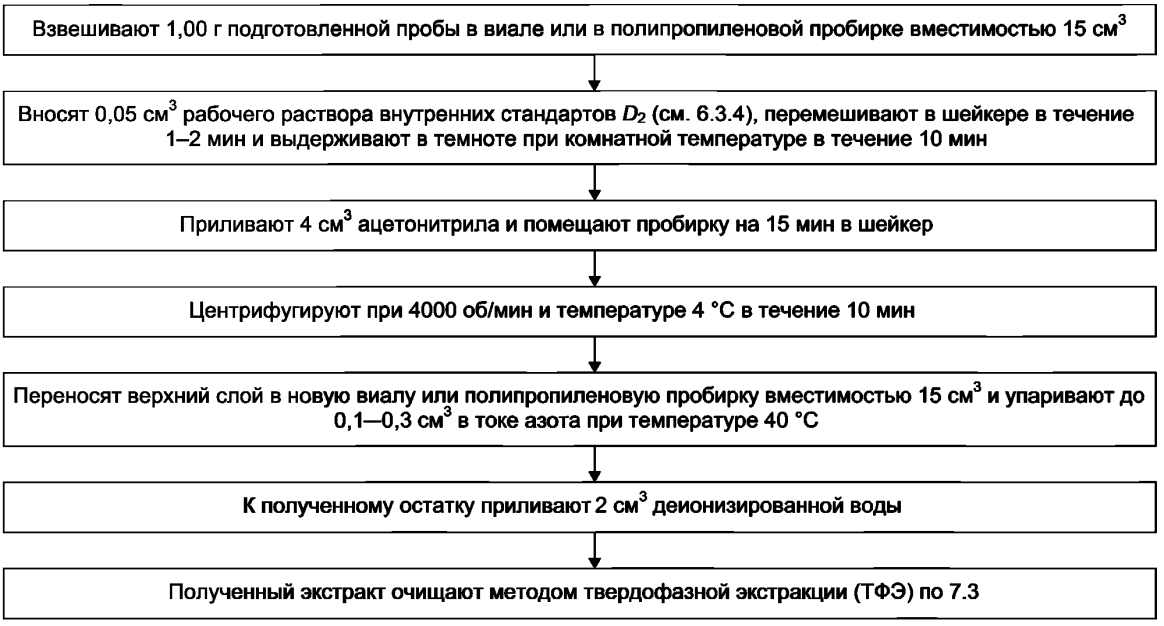

Рисунок 3 — Подготовка анализируемых проб

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия хроматографического разделения

8.1.1 Масс-спектрометр и хроматограф 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 диаметром 2,1 мм, длиной 150 мм, с обращенно-фазным сорбентом С18 с размером частиц не более 5,0 мкм, соблюдают следующие условия хроматографирования:

- температура колонки — 40 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,2 см^3/мин;
- объем вводимой пробы — 20 мм^3.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление подвижной фазы А в соответствии с 6.2, в качестве подвижной фазы Б используют ацетонитрил) в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 — Условия градиентного элюирования при регистрации положительных ионов

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %
0,0	100	0
1,0	100	0
11,0	5	95
11,1	100	0
20,0	100	0

8.1.3 Параметры режима ММР при измерении макролидов, линкозамидов, плевромутилинов приведены в таблице 4.

Параметры настройки масс-спектрометрического детектора:

- режим работы источника — ионизация электроспреем, *ESI*;
- напряжение на распыляющем капилляре (*IS*) 5500 В при регистрации положительных ионов;

- температура источника 450 °С;
- разрешение квадруполей Q1/Q3 — единичное;
- давление газа для фрагментации (*CAD*) — 6 кПа.

Таблица 4 — Параметры воздействия на ионы в режиме ММР с регистрацией положительных ионов

Аналит	Ион-предшественник, *m/z*	Ион-продукт, *m/z*		Время удерживания, мин	Энергия соударений, эВ		Ускоряющее напряжение на выходе из ячейки столкновений, В	
Спирамицин	422,2	100,9	174,1	7,04	22	16	25	28
Эритромицин	734,5	158	576,3	8,09	35	21	27	32
Кларитромицин	748,5	590,3	158	8,78	25	24	33	24
Тулатромицин	807,0	577,3	158	6,42	33	27	48	8
Тилмикозин	869,6	174,2	696,3	7,53	55	23	53	35
Тилвалозин	1042,6	229	174	9,58	35	25	33	28
Тилозин	916,5	772,1	174	8,20	49	22	39	36
Линкомицин	407,2	359,2	126	6,05	28	28	35	14
Клиндамицин	425,2	377,1	126	7,41	25	26	35	12
Пирлимицин	411,2	112	363	7,21	31	18	21	16
Валнемулин	565,4	263	147	8,96	21	30	51	26
Тиамулин	494,3	192	118,9	8,71	33	54	57	26
Рокситромицин-Д7*	844,7	686,4	—	8,79	31	—	30	—
Азитромицин-Д3*	752,7	594,5	—	7,09	39	—	27	—
Клиндамицин-Д3*	428,4	380	129	7,40	26	26	35	15
Валнемулин-Д6*	571,6	269,2	153,2	8,96	23	30	51	26
* Внутренний стандарт.								

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

8.1.4 Контроль чувствительности хромато-масс-спектрометрической системы осуществляют введением в инжектор хроматографа 20 мм^3 матричного градуировочного раствора G_8 (см. 6.3.5). Полученное соотношение сигнал/шум для каждого аналита должно быть не менее 10.

8.2 Построение градуировочной характеристики

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

8.2.1 Проводят измерения не менее четырех матричных градуировочных растворов, выбранных исходя из ожидаемой массовой концентрации аналитов в анализируемом образце и приготовленных по 6.3.5, в порядке возрастания их концентраций. Каждый градуировочный раствор измеряют два раза. Определяют значения времени 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 макролидов, линкозаминов, плевромутилинов проводят по одному, наиболее интенсивному ион-продукту. Для подтверждения наличия аналитов рассчитывают отношения площади пика двух ион-продуктов для каждого аналита в градуировочном растворе.

Соответствие аналитов и их внутренних стандартов указано в таблице 1.

8.2.3 Градуировочную характеристику строят в координатах «отношение площади пика определяемого соединения к площади пика внутреннего стандарта этого соединения» — «отношение концентра-

ций 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.

8.2.4 Построение линейного градуировочного графика и расчет концентрации макролидов, линкозамидов, плевромутилинов в анализируемых пробах выполняется системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.3 ВЭЖХ-МС/МС-измерение

8.3.1 Для измерения содержания макролидов, линкозамидов, плевромутилинов проводят ВЭЖХ-МС/МС-анализ в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования. Для каждого аналита проводят два параллельных измерения.

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

- подвижную фазу А;
- «чистую» пробу;
- матричные градуировочные растворы (см. 6.3.5);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

8.3.3 Определяют и регистрируют на хроматограмме время удерживания пиков двух ион-продуктов каждого аналита, соответствующее времени удерживания, найденному при измерении градуировочных растворов по 8.1.2.

9 Обработка результатов измерений

9.1 В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, проводят количественную обработку хроматограмм с использованием программного обеспечения, получая значения массовой концентрации макролидов, линкозамидов, плевромутилинов в двух параллельных измерениях анализируемой пробы.

9.2 Содержание i-го аналита X_i, мкг/кг, вычисляют по формуле

$$X_i = \frac{C_i \cdot V_i}{m_i}, \qquad (2)$$

где C_i — массовая концентрация аналита в анализируемой пробе, найденная по градуировочному графику, нг/см^3;

V_i — объем, до которого разбавлена проба, см^3;

m_i — масса анализируемой пробы, г.

9.3 За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений анализируемой пробы, если выполняется условие приемлемости по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение определения содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов с относительной расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата $k = 2$ и доверительной вероятности $P = 0,95$, указанной в таблицах 5—7.

Таблица 5 — Показатели точности и прецизионности метода при определении содержания макролидов, линкозамидов, плевромутилинов в мясе, мясных продуктах и полуфабрикатах, рыбе, креветках

Аналит	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Предел повторяемости r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %
Спирамицин	От 2 до 160 включ.	32	12	33	16
	Св. 160 до 320 включ.	24	8	21	12

Окончание таблицы 5

Аналит	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_j, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Предел повторяемости r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %
Эритромицин	От 10 до 40 включ.	34	12	33	15
	Св. 40 до 320 включ.	19	6	17	9
Тилмикозин	От 1 до 100 включ.	30	8	23	14
	Св. 100 до 160 включ.	18	5	13	9
Тилозин	От 1 до 20 включ.	33	12	34	16
	Св. 20 до 160 включ.	18	4	10	8
Тилвалозин	От 5 до 80 включ.	32	12	34	16
	Св. 80 до 160 включ.	16	4	12	8
Тулатромицин	От 1 до 40 включ.	43	16	44	22
	Св. 40 до 160 включ.	22	6	15	10
Кларитромицин	От 1 до 80 включ.	37	14	38	19
	Св. 80 до 160 включ.	22	7	19	11
Линкомицин	От 1 до 160 включ.	31	10	28	15
Клиндамицин	От 1 до 20 включ.	37	13	36	19
	Св. 20 до 160 включ.	14	4	10	7
Пирлимицин	От 1 до 80 включ.	26	8	22	12
	Св. 80 до 160 включ.	14	4	10	7
Валнемулин	От 1 до 20 включ.	67	26	71	34
	Св. 20 до 160 включ.	22	7	18	11
Тиамулин	От 1 до 160 включ.	28	10	28	14

Таблица 6 — Показатели точности и прецизионности метода при определении содержания макролидов, линкозамидов, плевромутилинов в субпродуктах

Аналит	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_j, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Предел повторяемости r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %
Спирамицин	От 20 до 3200 включ.	34	11	30	17
Эритромицин	От 10 до 160 включ.	48	12	33	24
	Св.160 до 320 включ.	14	4	11	7
Тилмикозин	От 10 до 200 включ.	48	18	49	24
	Св. 200 до 1600 включ.	28	9	25	14
Тилозин	От 1 до 20 включ.	48	11	31	24
	Св. 20 до 160 включ.	20	7	20	10

Окончание таблицы 6

Аналит	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Предел повторяемости r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %
Тилвалозин	От 5 до 160 включ.	52	19	52	26
Тулатромицин	От 20 до 400 включ.	42	14	39	21
	Св. 400 до 3200 включ.	18	6	18	9
Кларитромицин	От 1 до 20 включ.	72	12	34	32
	Св. 20 до 160 включ.	16	5	14	8
Линкомицин	От 15 до 2400 включ.	43	15	40	21
Клиндамицин	От 15 до 300 включ.	34	11	31	17
	Св. 300 до 2400 включ.	24	8	23	12
Пирлимицин	От 10 до 200 включ.	85	14	40	38
	Св. 200 до 1600 включ.	23	8	22	10
Валнемулин	От 5 до 100 включ.	28	9	24	14
	Св. 100 до 800 включ.	16	4	11	8
Тиамулин	От 10 до 800 включ.	58	11	29	26
	Св. 800 до 1600 включ.	28	9	26	14

Таблица 7 — Показатели точности и прецизионности метода при определении содержания макролидов, линкозамидов, плевромутилинов в молоке, молочных продуктах, в том числе сыре

Аналит	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Предел повторяемости r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %
Спирамицин	От 2 до 320 включ.	21	6	18	10
Эритромицин	От 10 до 40 включ.	28	9	26	14
	Св. 40 до 320 включ.	18	5	14	9
Тилмикозин	От 1 до 20 включ.	59	12	34	27
	Св. 20 до 160 включ.	28	9	25	14
Тилозин	От 5 до 20 включ.	24	8	22	12
	Св. 20 до 160 включ.	18	6	17	9
Тилвалозин	От 1 до 160 включ.	19	7	20	9
Тулатромицин	От 1 до 40 включ.	41	9	26	18
	Св. 40 до 160 включ.	20	7	18	10
Кларитромицин	От 1 до 80 включ.	30	7	18	14
	Св. 80 до 160 включ.	10	3	7	5

Окончание таблицы 7

Аналит	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Предел повторяемости r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %
Линкомицин	От 1,5 до 30 включ.	33	8	23	15
	Св. 30 до 240 включ.	16	5	14	8
Клиндамицин	От 1 до 20 включ.	27	9	26	14
	Св. 20 до 160 включ.	12	4	12	6
Пирлимицин	От 1 до 20 включ.	22	7	20	10
	Св. 20 до 160 включ.	17	5	13	8
Валнемулин	От 20 до 160 включ.	16	5	13	8
Тиамулин	От 1 до 160 включ.	24	6	15	11

11 Оформление результатов измерений

Содержание *i*-го аналита, мкг/кг, представляют в виде

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

где $\bar{X}_i$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений содержания *i*-го аналита в анализируемой пробе, мкг/кг (см. 9.3);

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания *i*-го аналита для соответствующего диапазона измерений, % (в соответствии с таблицами 5—7);

$0{,}01 \cdot U_i \cdot \bar{X}_i$ — значение расширенной неопределенности в абсолютных единицах, мкг/кг.

Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение расширенной неопределенности, содержащее не более четырех значащих цифр и выраженное в микрограммах на килограмм (мкг/кг).

12 Контроль стабильности результатов измерений

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

УДК 637.07:614.3:006.354

МКС 67.050
67.100
67.120.10
67.120.20
67.120.30

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, макролиды, линкозамиды и плевромутилины, метод определения содержания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 26.11.2018. Подписано в печать 04.12.2018. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении 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