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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33978— 2016

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ И КОМБИКОРМА

Метод определения содержания тиреостатиков с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

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 25 октября 2016 г. № 92-П)

За принятие проголосовали:

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 14 марта 2017 г. № 139-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33978—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2018 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*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, 2017

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 2
4 Требования безопасности и условия выполнения измерений 2
5 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы 2
6 Подготовка к проведению измерений 4
6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов 4
6.2 Приготовление растворов 4
6.3 Приготовление градуировочных растворов 5
7 Отбор и подготовка проб 7
7.1 Отбор проб 7
7.2 Подготовка проб 7
7.3 Очистка подготовленных проб методом твердофазной экстракции 7
8 Порядок выполнения анализа 8
8.1 Условия ВЭЖХ-МС/МС измерений 8
8.2 Построение градуировочных графиков и проведение измерений 9
9 Метрологические характеристики 10
10 Обработка результатов измерений 10
11 Оформление результатов измерений 11
12 Контроль стабильности результатов измерений 11

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ И КОМБИКОРМА

Метод определения содержания тиреостатиков с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Food products and mixed feeds. Method for determination of thyreostats by high performance liquid chromatography—mass spectrometry

Дата введения — 2018—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на непереработанные пищевые продукты — мясо (в том числе мясо птицы), субпродукты (печень), комбикорма, а также на мочу животных и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (далее — ВЭЖХ-МС/МС) для определения содержания тиреостатиков. Диапазон измерений содержания 6-пропил-2-тиоурацила, 6-метил-2-тиоурацила, 2-тиоурацила, 6-фенил-2-тиоурацила составляет от 2,0 до 30,0 мкг/кг, диапазон измерений содержания 2-меркаптобензимидазола составляет от 0,4 до 30,0 мкг/кг.

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

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 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4198—75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

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

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

Издание официальное

ГОСТ ISO 6497—2014 Корма. Отбор проб

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 9968—86 Метилен хлористый технический. Технические условия

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

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

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

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 экстракции тиреостатиков из анализируемой пробы, дериватизации и очистки методом твердофазной экстракции, с последующим их количественным определением методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (*MRM*). Количественное определение тиреостатиков 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 класса 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 К выполнению измерений методом ВЭЖХ-МС/МС допускаются лица, владеющие техникой ВЭЖХ-МС/МС и изучившие инструкции по эксплуатации применяемой аппаратуры.

4.6 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... от 20 °С до 30 °С;
- атмосферное давление ..... от 84 до 106 кПа;
- напряжение в питающей электросети ..... от 200 до 240 В;
- частота переменного тока ..... от 49 до 51 Гц;
- относительная влажность воздуха ..... от 40 % до 80 %.

5 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы

5.1 Для определения содержания тиреостатиков применяют следующие средства измерений, аппаратуру, посуду и материалы:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности не более ± 0,001 г;
- весы микроаналитические утвержденного типа, высокого (II) класса точности, поверенные в установленном порядке с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,02 мг;

- масс-спектрометр с квадрупольным анализатором с диапазоном измерений от 50 до 500 атомных единиц массы (а. е. м.), массовым разрешением не менее 1,0 а. е. м. на полувысоте пика, точностью измерения массы не менее 0,5 а. е. м., с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС);

- систему высокоэффективную жидкостную хроматографическую, состоящую из бинарного насоса со смесителем, системы фильтрования и дегазации подвижных фаз, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до (50 ± 1) °С;

- pH-метр или универсальный иономер диапазоном измерения от 4 до 9 ед. pH с погрешностью измерения ± 0,05 ед. pH;

- 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 и диапазоном скоростей от 150 до 2000 об/мин;

- измельчитель-гомогенизатор лабораторный погружной;

- камеру лабораторную морозильную с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С;

- колонку хроматографическую длиной 150 мм и диаметром 2,1 мм с обращенно-фазным сорбентом С18, и диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм;

- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений, аттестованным в установленном порядке;

- модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и максимальной температурой термостатирования не менее 50 °С;

- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением 18 МОм·см;

- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;

- холодильник бытовой с морозильной камерой, цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С;

- центрифугу лабораторную рефрижераторную с центробежным ускорением не менее 3500 g и диапазоном температур от 4 °С до 20 °С;

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

- картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 12 $см^3$, заполненные 0,5 г силикагеля с диаметром частиц от 15 до 100 мкм;

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

- виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 $см^3$ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками;

- виалы или пробирки полипропиленовые вместимостью 15 и 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками;

- колбы 2-10-1 с пришлифованными пробками по ГОСТ 1770;

- колбы 1-100(1000)-2 по ГОСТ 1770;

- колбы конические Кн-1-250(500, 1000)-29/32 ТС по ГОСТ 25336;

- пипетки 2-2-1-5(10, 25) по ГОСТ 29227;

- пипетки одноканальные переменной вместимости 20—200 $мм^3$ с пределом допускаемого относительного отклонения среднеарифметического значения фактического объема дозы от номинального не более ± 1,5 %;

- пипетки одноканальные переменной вместимости 100—1000 $мм^3$ с пределом допускаемого относительного отклонения среднеарифметического значения фактического объема дозы от номинального не более ± 1 %;

- цилиндры 1-50(100, 1000)-1 по ГОСТ 1770.

5.2 При определении содержания тиреостатиков применяют следующие реактивы:

- 3-йодбензилбромид, ч. д. а.;

- ацетон по ГОСТ 2603;

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

- дихлорметан по ГОСТ 9968, х. ч.;

- калия дигидрофосфат по ГОСТ 4198, ч. д. а.;

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

- кислоту соляную по ГОСТ 3118, х. ч.;
- метанол по ГОСТ 6995, х. ч.;
- натрия гидроксид по ГОСТ 4328, ч. д. а.;
- натрия гидрофосфат дигидрат, ч. д. а.;
- н-гексан, х. ч.;
- этилацетат по ГОСТ 22300, ч. д. а.;
- эфир диэтиловый, х. ч.

5.3 При определении содержания тиреостатиков в качестве образцов сравнения применяют соединения с массовой долей основного вещества не менее 98,0 %.

5.3.1 Для приготовления исходных растворов:
- 2-меркаптобензимидазол;
- 2-тиоурацил;
- 6-метил-2-тиоурацил;
- 6-пропил-2-тиоурацил;
- 6-фенил-2-тиоурацил.

5.3.2 Для приготовления исходного раствора внутреннего стандарта:
- 5,6-диметил-2-тиоурацил.

5.4 Допускается применение других средств измерений и посуды, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также аппаратуры, реактивов и материалов по качеству не хуже 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 растворов

6.2.1 Приготовление раствора метанол — деионизированная вода в объемном соотношении 2:1

В коническую колбу вместимостью 250 см^3 вносят 100 см^3 метанола и 50 см^3 деионизированной воды, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более трех месяцев.

6.2.2 Приготовление раствора метанол — деионизированная вода в объемном соотношении 4:1

В коническую колбу вместимостью 250 см^3 вносят 200 см^3 метанола и 50 см^3 деионизированной воды, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более трех месяцев.

6.2.3 Приготовление раствора натрия гидрофосфата молярной концентрации 0,2 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 35,6 г натрия гидрофосфат дигидрата, доводят объем до метки деионизированной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более одного месяца.

6.2.4 Приготовление раствора калия дигидрофосфата молярной концентрации 0,2 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 27,2 г калия дигидрофосфата, доводят объем до метки деионизированной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более одного месяца.

6.2.5 Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 8,0 ед. pH

В конической колбе вместимостью 1000 см^3 смешивают 945 см^3 раствора гидрофосфата натрия (см. 6.2.3) и 55 см^3 раствора дигидрофосфата калия (см. 6.2.4). Измеряют pH, устанавливают его значение до (8,0 ± 0,1) ед. pH раствором гидроксида натрия (см. 6.2.9) или раствором соляной кислоты (см. 6.2.10).

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более одного месяца.

6.2.6 Приготовление раствора 3-йодбензилбромида массовой концентрацией 5 мг/см^3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 50,0 мг 3-йодбензилбромида, доводят объем раствора метанолом до верхней метки на колбе.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более одних суток.

6.2.7 Приготовление раствора дихлорметан — гексан в объемном соотношении 1:3

В коническую колбу вместимостью 500 см^3 вносят 100 см^3 дихлорметана и 300 см^3 гексана, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более трех месяцев.

6.2.8 Приготовление раствора этилацетат — гексан в объемном соотношении 2:3

В коническую колбу вместимостью 500 см^3 вносят 200 см^3 этилацетата и 300 см^3 гексана, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более трех месяцев.

6.2.9 Приготовление раствора натрия гидроксида с концентрацией 1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 90 см^3 деионизированной воды и 4,0 г гидроксида натрия, перемешивают, после чего объем в колбе доводят до метки деионизированной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более трех месяцев.

6.2.10 Приготовление раствора соляной кислоты с концентрацией 1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 90 см^3 деионизированной воды и с помощью пипеточного дозатора добавляют 8,6 см^3 концентрированной соляной кислоты, после чего объем в колбе доводят до метки деионизированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более трех месяцев.

6.3 Приготовление градуировочных растворов

6.3.1 Приготовление исходных стандартных растворов тиреостатиков массовыми концентрациями 1000 мкг/см^3 (растворы C_0)

Готовят индивидуальные исходные стандартные растворы каждого тиреостатика концентрациями C_0, равными 1000 мкг/см^3 каждый.

Для приготовления исходного стандартного раствора *i*-го тиреостатика в отдельную мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают рассчитанную массу соответствующего химического вещества, эквивалентную 10 мг чистого тиреостатика, взвешенную с точностью до 0,1 мг. Добавляют 8 см^3 раствора метанол — деионизированная вода (см. 6.2.1) и помещают в ультразвуковую баню на 10 мин, затем доводят объем полученного раствора при температуре (20 ± 2) °С до 10 см^3 этим же растворителем по метке на колбе.

Массу *i*-го химического вещества эквивалентную 10 мг *i*-го тиреостатика рассчитывают по формуле

$$m_i = C \cdot V \cdot \frac{100}{P_i} \cdot 0{,}001, \quad (1)$$

где C — концентрация стандартного раствора, мкг/см^3;

V — объем исходного стандартного раствора, см^3;

P_i — массовая доля *i*-го тиреостатика в химическом веществе, %;

0,001 — коэффициент пересчета массы из мкг в мг.

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 тиреостатиков массовыми концентрациями 2 мкг/см^3 (раствор C_1) и 0,04 мкг/см^3 (раствор C_2)

Рабочие стандартные растворы C_1, C_2 готовят в мерных колбах вместимостью 10 см^3 согласно рисунку 1.

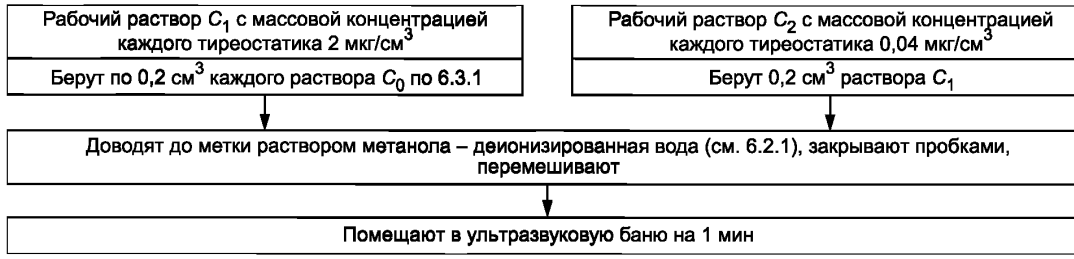

Рисунок 1 — Приготовление рабочих растворов С1, С2

Раствор C_1 хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более одного года.

Перед применением раствор C_1 выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

Раствор C_2 хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одних суток.

6.3.3 Приготовление исходного раствора внутреннего стандарта тиреостатиков массовой концентрацией 200 мкг/см^3 (раствор D_0)

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят рассчитанную по формуле (1) массу 5,6-диметил-2-тиоурацила эквивалентную 2 мг основного вещества, взвешенную с точностью до 0,1 мг. Добавляют 8 см^3 раствора метанол — деионизированная вода (см. 6.2.1) и помещают в ультразвуковую баню на одну минуту, затем доводят объем полученного раствора при температуре (20 ± 2) °С этим же растворителем до 10 см^3 по метке на колбе.

Раствор хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С. Срок годности — не более одного года.

Перед применением раствор D_0 выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.4 Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта тиреостатиков массовой концентрацией 1 мкг/см^3 (раствор D_1)

Для приготовления рабочего раствора D_1 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 переносят 0,05 см^3 раствора D_0, доводят до метки раствором метанол — деионизированная вода (см. 6.2.1), закрывают пробкой и перемешивают.

Раствор хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С. Срок годности — не более шести месяцев.

Перед применением раствор D_1 выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.5 Приготовление матричных градуировочных растворов тиреостатиков (растворы G_1, G_2, G_3 и G_4)

Матричные градуировочные растворы G_1 — G_4 готовят в виалах или пропиленовых пробирках вместимостью 50 см^3 из «чистых» проб массой 2,00 г, в которые вносят раствор внутреннего стандарта D_1 и рабочие растворы определяемых тиреостатиков C_1, C_2 в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1 — G_4

Обозначение и массовая концентрация приготовляемого матричного градуировочного раствора	Вносимый объем рабочего раствора, см^3		
	C_1	C_2	D_1
G_1 (60,0 нг/см^3)	0,03	—	0,04
G_2 (16,0 нг/см^3)	—	0,40	0,04
G_3 (4,0 нг/см^3)	—	0,10	0,04
G_4 (0,8 нг/см^3)	—	0,02	0,04

Виалы (пробирки) встряхивают в шейкере в течение одной минуты и проводят дальнейшую обработку проб согласно разделу 7.

Срок хранения растворов G_1 — G_4 при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч.

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 птицы, печени — по ГОСТ 31467.

7.1.3 Объем отбираемых проб мочи должен быть не менее 40 см^3.

7.1.4 Отбор проб комбикормов — по ГОСТ ISO 6497.

7.1.5 Пробы, отобранные по 7.1.1 и 7.1.2, при отсутствии возможности проведения анализа в день отбора замораживают и хранят при температуре минус 25 °С до проведения испытания, но не более 90 сут.

7.2 Подготовка проб

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. Обработку анализируемой пробы проводят в соответствии с рисунком 2.

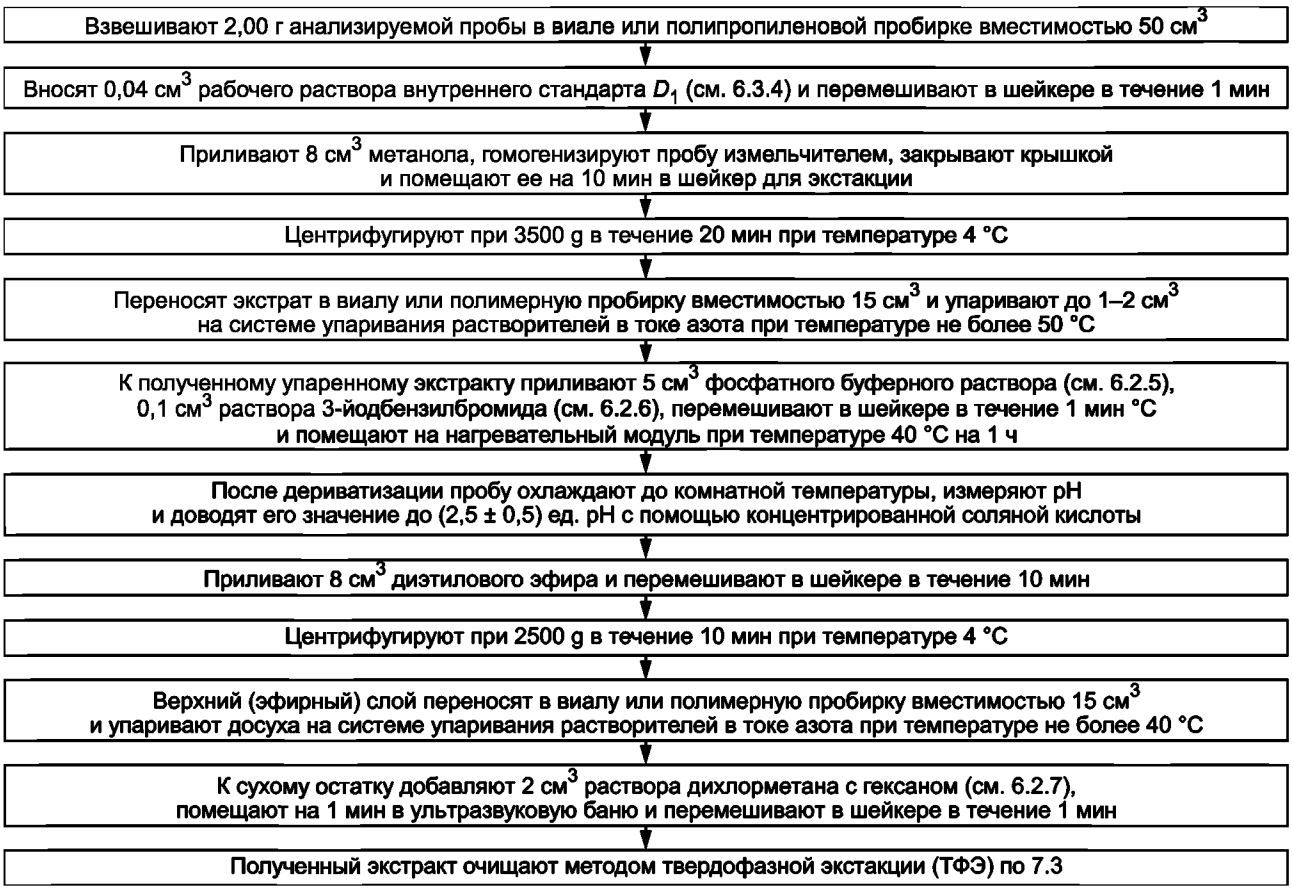

Рисунок 2 — Подготовка проб мяса, включая мясо птицы, печени, комбикормов, мочи

7.3 Очистка подготовленных проб методом твердофазной экстракции

Картриджи для твердофазной экстракции кондиционируют на вакуумном устройстве для ТФЭ, пропуская 10 см^3 гексана. Затем через картридж пропускают пробу, полученную в соответствии с 7.2. Промывают картридж 5 см^3 гексана. Определяемые вещества элюируют с сорбента 10 см^3 раствора этилацетат — гексан (см. 6.2.8) в виалу или полимерную пробирку вместимостью 15 см^3. Упаривают элюат досуха на системе упаривания растворителей при температуре не более 40 °С. Остаток перерастворяют в 1 см^3 раствора метанол — деионизированная вода (см. 6.2.2), помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на одну минуту и центрифугируют при 3500 g в течение 15 мин при температуре 4 °С. Переносят экстракт в стеклянную виалу вместимостью 2 см^3 и используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия ВЭЖХ-МС/МС измерений

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

8.1.2 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 (в качестве подвижной фазы А используют деионизированную воду, подвижной фазы Б — метанол) в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Условия градиентного элюирования

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б,%
0,0	25	75
11,0	15	85
13,0	15	85
13,1	25	75
23,0	25	75

8.1.3 Параметры воздействия на ионы в режиме мониторинга множественных реакций (*MRM*) приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Параметры воздействия на ионы в режиме *MRM* при ионизации электрораспылением с регистрацией отрицательных ионов

Тиреостатик	Ион-предшественник, *m/z*	Ион-продукт, *m/z*	Потенциал декластеризации, В	Энергия соударений, эВ	Ускоряющее напряжение на выходе из ячейки столкновений, В
2-Тиоурацил	343	126,9	-80	-28	-11
	343	94,9	-80	-27	-11
6-Метил-2-тиоурацил	357	126,9	-80	-30	-11
	357	108,9	-80	-27	-11
2-Меркаптобензимидазол	365	147,9	-80	-30	-11
	365	103,9	-80	-53	-11
6-Пропил-2-тиоурацил	385	126,9	-80	-30	-11
	385	350,9	-80	-25	-11
6-Фенил-2-тиоурацил	419	170,9	-80	-30	-11
	419	126,9	-80	-35	-11
5,6-Диметил-2-тиоурацил*	371	126,9	-80	-30	-11
	371	153,9	-80	-34	-11
* Внутренний стандарт.					

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

8.1.4 Параметры источника ионизации и квадрупольного анализатора:

- напряжение на распыляющем капилляре (IS) минус 4500 В при регистрации отрицательных ионов;
- разрешение квадруполей Q1/Q3 — единичное;
- давление газа для фрагментации (CAD) — 41 кПа.

8.1.5 Контроль чувствительности методики осуществляют введением 20 мм^3 матричных градуировочных растворов G_3 и G_4 (см. 6.3.5) в инжектор хроматографа. При анализе раствора G_3 полученное соотношение сигнал/шум для каждого тиреостатика, за исключением 2-меркаптобензимидазола, должно быть не менее 3. При анализе раствора G_4 полученное соотношение сигнал/шум для 2-меркаптобензимидазола должно быть не менее 3.

8.2 Построение градуировочных графиков и проведение измерений

8.2.1 ВЭЖХ-МС/МС анализ выполняют в виде серии измерений, включающей следующие образцы:

- образец подвижной фазы А — для уравновешивания ВЭЖХ-МС/МС системы;
- чистую пробу;
- градуировочные растворы (см. 6.3.5);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

8.2.2 Определяют и регистрируют на хроматограмме времена удерживания пиков двух ионов-продуктов каждого тиреостатика, соответствующее времени удерживания, найденному при измерении градуировочных растворов в условиях по 8.1.1, 8.2.1. Проводят измерения градуировочных растворов, приготовленных по 6.3.5, в порядке возрастания их концентраций. Для построения градуировочного графика 2-меркаптобензимидазола используют данные анализа градуировочных растворов G_1, G_2, G_3, G_4; для построения градуировочных графиков других тиреостатиков используют данные анализа растворов G_1, G_2, G_3.

8.2.3 Вычисление площади пика проводят для каждого иона-продукта анализируемых тиреостатиков и их внутреннего стандарта. Количественное определение каждого тиреостатика проводят по одному, наиболее интенсивному, иону-продукту.

Для подтверждения достоверности определения аналитов при анализе градуировочных растворов для каждого тиреостатика определяют значение отношения площади пика менее интенсивного иона-продукта к площади пика более интенсивного иона-продукта — относительную ионную интенсивность. Значение отклонений относительных ионных интенсивностей, полученные в экстрактах анализируемых проб, не должны превышать установленных по градуировочным растворам значений более, чем указано в таблице 4.

Таблица 4 — Допустимые отклонения относительных ионных интенсивностей

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

8.2.4 Построение градуировочных графиков проводят в каждой серии анализов с помощью программного обеспечения хромато-масс-спектрометра.

При построении градуировочной характеристики используют линейную регрессию вида $y = a + bx$ (где y является отношением площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта, x — отношением концентраций аналита и внутреннего стандарта), при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

8.2.5 Построение линейного градуировочного графика и расчет содержания тиреостатиков в анализируемых пробах выполняется системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.2.6 Градуировочную характеристику считают приемлемой, если рассчитанное с помощью компьютерной системы обработки данных значение коэффициента корреляции (коэффициент регрессии) каждого тиреостатика ≥ 0,98, а значения отклонения содержания массовой доли определяемых соединений, рассчитанные по формуле (2), для каждой точки градуировочной характеристики не превышают 20 %:

$$\frac{|C_{\text{град.}} - C_{\text{расч.}}| \cdot 100}{C_{\text{расч.}}} \le 20\%, \quad (2)$$

где $C_{\text{град.}}$ — содержание определяемого соединения, найденное по градуировочной характеристике, мкг/кг,

$C_{\text{расч.}}$ — содержание определяемого соединения в градуировочном растворе, мкг/кг.

9 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений содержания тиреостатиков с расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата $k = 2$ и доверительной вероятности $P = 0,95$, указанной в таблице 5.

Таблица 5 — Показатели точности метода при проведении измерений содержания тиреостатиков

Тиреостатик	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, % (при $P = 0,95$, $k = 2$)	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости), σ_R, %
6-Пропил-2-тиоурацил	От 2,0 до 15,0 включ.	63	22	61	32
	Св. 15,0 до 30,0 включ.	30	10	28	15
6-Метил-2-тиоурацил	От 2,0 до 30,0 включ.	32	12	33	16
2-Меркапто-бензимидазол	От 0,4 до 8,0 включ.	59	21	58	28
	Св. 8,0 до 30,0 включ.	37	13	36	16
2-Тиоурацил	От 2,0 до 8,0 включ.	69	30	83	35
	Св. 8,0 до 30,0 включ.	33	14	39	15
6-Фенил-2-тиоурацил	От 2,0 до 8,0 включ.	63	21	58	32
	Св. 8,0 до 30,0 включ.	43	15	42	22

10 Обработка результатов измерений

10.1 Расчет содержания i-го тиреостатика, мкг/кг, выполняется в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения хромато-масс-спектрометра по формуле

$$X_i = \frac{c_i V_i}{m_i}, \quad (3)$$

где c_i — концентрация i-го тиреостатика в анализируемой пробе, найденная по градуировочному графику, нг/см^3;

V_i — объем разведения сухого остатка, см^3;

m_i — масса навески анализируемой пробы, г.

10.2 За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости:

$$\frac{2|X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r, \quad (4)$$

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

r — значение предела повторяемости, % (в соответствии с таблицей 5).

10.3 Если условие (4) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данной методикой измерений. За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие:

$$\frac{4|X_{max} - X_{min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \le CR_{0,95}, \quad (5)$$

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

$CR_{0,95}$ — значение критического диапазона для уровня вероятности $P = 0,95$ и n-результатов определений.

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

для $n = 4$

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

где σ_r — показатель повторяемости, % (в соответствии с таблицей 5).

10.4 Если условие (5) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

11 Оформление результатов измерений

Содержание i-го тиреостатика, мкг/кг, представляют в виде

$$\overline{X}_i \pm 0,01U_i\overline{X}_i, \text{ при } P = 0,95, \quad (7)$$

где $\overline{X}_i$ — среднее арифметическое значение вычислений двух параллельных измерений содержания i-го тиреостатика в анализируемой пробе (см. 10.2), мкг/кг;

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

$0,01U_i\overline{X}_i$ — 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 двух значащих цифр.

12 Контроль стабильности результатов измерений

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

УДК 636.085:637.071:006.354 МКС 65.120
67.050
67.120

Ключевые слова: пищевые продукты, комбикорма, моча животных, тиреостатики, метод определения содержания тиреостатиков с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Редактор *А.Э. Попова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 16.03.2017. Подписано в печать 18.04.2017. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68. Тираж 33 экз. Зак. 524.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru