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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33971— 2016

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 ноября 2016 г. № 1692-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33971—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, 2016

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 . . . 4
7 Отбор и подготовка проб . . . 6
7.1 Отбор проб . . . 6
7.2 Подготовка проб мяса, печени, почек, включая мясо и печень птицы . . . 6
8 Порядок выполнения анализа . . . 7
8.1 Условия хроматографических измерений . . . 7
8.2 Построение градуировочной характеристики . . . 8
8.3 ВЭЖХ-МС/МС измерение . . . 9
9 Обработка результатов измерений . . . 9
10 Метрологические характеристики . . . 9
11 Оформление результатов измерений . . . 10
12 Контроль стабильности результатов измерений . . . 10

Поправка к ГОСТ 33971—2016 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 4.7	- температура окружающего воздуха . . . от 20 °С до 30 °С;	- температура окружающего воздуха . . . от 15 °С до 30 °С;
	- напряжение в питающей электросети . . . от 200 до 240 В;	—
	- частота переменного тока . . . от 49 до 51 Гц;	—
	- относительная влажность воздуха . . . от 40 % до 80 %.	- относительная влажность воздуха . . . от 20 % до 80 %.

(ИУС № 7 2017 г.)

МКС 67.050, 67.120

Поправка к ГОСТ 33971—2016 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 5.1, первое перечисление	наибольшим пределом взвешивания не более 150 г и	—
второе перечисление	- весы утвержденного типа с наибольшим пределом взвешивания не более 82 г, поверенные в установленном порядке, с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,02 мг;	- весы специального класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления шкалы не более 0,1 мг;

(ИУС № 4 2020 г.)

МКС 67.050
67.120

Поправка к ГОСТ 33971—2016 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 4 2020 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Food products, food raw materials. Method for determination of residual metabolites of carbadox and olaquindox using high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detector

Дата введения — 2018—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на непереработанные пищевые продукты: мясо животных всех видов, в том числе мясо птицы, субпродукты (печень, почки) и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (далее — ВЭЖХ-МС/МС) для определения остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса в диапазоне измерений от 0,5 до 8,0 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 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

* 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 9293—74 (ИСО 2435—73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

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

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 метаболитов карбадокса и олаквиндокса раствором сульфосалициловой кислоты, переэкстракции в этилацетат, концентрировании и перерастворении полученного экстракта, с последующим их количественным определением методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Количественное определение остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса (аналитов) 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 Утилизацию отходов проб и реактивов осуществляют в соответствии с требованиями законодательства государства, принявшего стандарт.

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

4.7 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 остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса применяют следующие средства измерений, аппаратуру, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с наибольшим пределом взвешивания не более 150 г и пределом допускаемой абсолютной погрешности ±0,01 г;
- весы утвержденного типа с наибольшим пределом взвешивания не более 82 г, поверенные в установленном порядке, с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,02 мг;
- масс-спектрометр с квадрупольным анализатором диапазоном измерений от 50 до 300 атомных единиц массы (а. е. м.), массовым разрешением не менее 1 а. е. м. на полувысоте пика, с пределами

допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,5 а. е. м., с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС);

- 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 2500 об/мин;
- встряхиватель (шейкер) переворачивающий орбитального типа, с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об/мин;
- генератор азота высокой чистоты;
- 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, диаметром 2 мм, с обращено-фазным сорбентом С18 и диаметром частиц сорбента не более 5 мкм;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений, аттестованный в установленном порядке;
- 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;
- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением 18 МОм · см;
- систему концентрирования растворителей, обеспечивающую поддержание температуры не менее (50 ± 1) °С;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и 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 и 50 $см^3$;
- центрифугу лабораторную с диапазоном скоростей от 300 до 15000 об/мин и адаптером для микроцентрифужных пробирок;
- шкаф сушильный с максимальной температурой нагрева не менее 110 °С и погрешностью поддержания заданной температуры не более 5 °С;
- пробы, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, в зависимости от типа исследуемой матрицы, в которых не выявлено наличие метаболитов карбадокса и олаквиндокса («чистые» пробы)*;
- фильтры нейлоновые мембранные с порами диаметром от 0,2 до 0,45 мкм;
- виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 $см^3$ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм;
- колбы 1–10(50,1000)–2 по ГОСТ 1770;
- пипетки 2–2–1– 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 микроцентрифужные вместимостью 1,5 $см^3$;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 и 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками;
- цилиндры 1–500–1 по ГОСТ 1770.

5.2 При определении остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса применяют следующие реактивы:

- азот газообразный марки 60 по ГОСТ 9293, ос. ч.;
- ацетон по ГОСТ 2603;
- ацетонитрил для ВЭЖХ-МС 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.;
- н-гексан, х. ч.;
- кислоту сульфосалициловую с массовой долей основного вещества не менее 95 %;
- эфир этиловый уксусной кислоты (этилацетат) по ГОСТ 22300, ч. д. а.

---

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

5.3 При определении остаточного содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса в качестве образцов сравнения применяют следующие соединения:

1) для приготовления исходных растворов:

- 1,4-бисдезоксикарбадокс с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %;
- 3-метилхиноксалин-2-карбоновую кислоту с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %;
- хиноксалин-2-карбоновую кислоту с массовой долей основного вещества не менее 97,0 %;

2) для приготовления исходных растворов внутренних стандартов:

- 1,4-бисдезоксикарбадокс-D3 с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %;
- хиноксалин-2-карбоновую кислоту-D4 с массовой долей основного вещества не менее 97,0 %.

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 подвижных фаз А и Б

6.2.1.1 Приготовление подвижной фазы А

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 500 см^3 деионизированной воды, добавляют 1 см^3 муравьиной кислоты и доводят объем раствора деионизированной водой до метки.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.2.1.2 Приготовление подвижной фазы Б

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 500 см^3 метанола, добавляют 1 см^3 муравьиной кислоты и доводят объем до метки метанолом.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 6 мес.

6.2.2 Приготовление 3 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 30 г сульфосалициловой кислоты, добавляют 500 см^3 деионизированной воды, перемешивают до полного растворения вещества и доводят до метки деионизированной водой.

Раствор используют свежеприготовленным.

6.2.3 Приготовление 0,5 %-ного раствора муравьиной кислоты

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 0,25 см^3 муравьиной кислоты, доводят деионизированной водой до метки, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.3 Приготовление градуировочных растворов

6.3.1 Приготовление исходных стандартных растворов метаболитов карбадокса и олаквиндокса массовой концентрацией 1000 мкг/см^3 (растворы C_0)

Для приготовления исходных стандартных растворов C_0 концентрацией 1000 мкг/см^3 для каждого аналита рассчитывают необходимую массу *i*-го вещества, эквивалентную 10,0 мг анализируемого соединения, исходя из содержания основного вещества, по формуле

$$m_i = 10\,\frac{100}{P_i}, \qquad (1)$$

где m_i — масса навески i-го вещества, мг;

10 — требуемая масса чистого вещества, мг;

100 — коэффициент перевода процентов в относительное значение;

P_i — содержание основного вещества в аналитическом стандарте, %.

В мерные колбы вместимостью 10 см^3 вносят по отдельности рассчитанные массы хиноксалин-2-карбоновой кислоты, 3-метилхиноксалин-2-карбоновой кислоты, 1,4-бисдезоксикарбадокса, добавляют по 5 см^3 метанола, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 5 мин, затем доводят до верхней метки метанолом.

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 C_1, C_2, C_3

Рабочие растворы C_1, C_2, C_3 готовят в мерных колбах вместимостью 10 см^3 согласно рисунку 1.

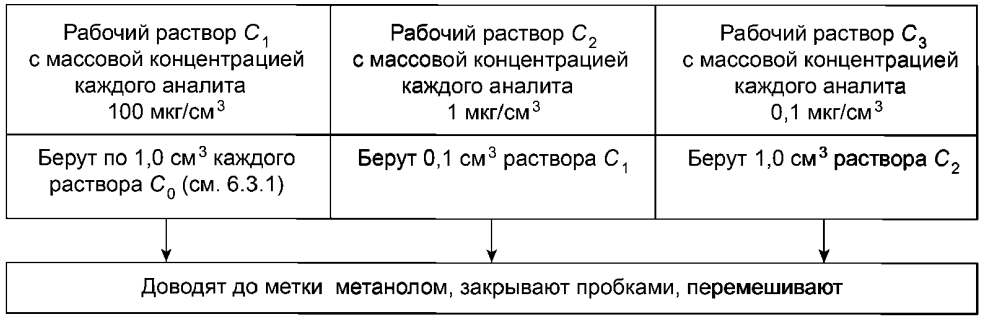

Рисунок 1 — Приготовление рабочих растворов C_1, C_2, C_3

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 одного года, C_2 — не более 6 мес, C_3 — не более 3 мес.

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

6.3.3 Приготовление исходных растворов внутренних стандартов метаболитов карбадокса и олаквиндокса массовой концентрацией 1000 мкг/см^3 (растворы D_0)

Для приготовления исходных растворов внутренних стандартов D_0 массовой концентрацией 1000 мкг/см^3 для каждого аналита рассчитывают необходимую массу i-го вещества, эквивалентную 10,0 мг чистого вещества внутреннего стандарта, по формуле (1).

В мерные колбы вместимостью 10 см^3 вносят по отдельности рассчитанную массу хиноксалин-2-карбоновой кислоты-D4 и 1,4-бисдезоксикарбадокса-D3, добавляют по 5 см^3 метанола, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 5 мин, затем доводят до верхней метки метанолом.

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.

Внутренние стандарты для метаболитов карбадокса и олаквиндокса выбирают в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Соответствие между аналитами и внутренними стандартами

Наименование определяемого аналита	Наименование внутреннего стандарта определяемого аналита
Хиноксалин-2-карбоновая кислота	Хиноксалин-2-карбоновая кислота-D4
3-Метилхиноксалин-2-карбоновая кислота	
1,4-Бисдезоксикарбадокс	1,4-Бисдезоксикарбадокс-D3

6.3.4 Приготовление рабочих растворов внутренних стандартов D_1, D_2

Рабочие растворы D_1, D_2 готовят в мерных колбах вместимостью 10 см^3 согласно рисунку 2.

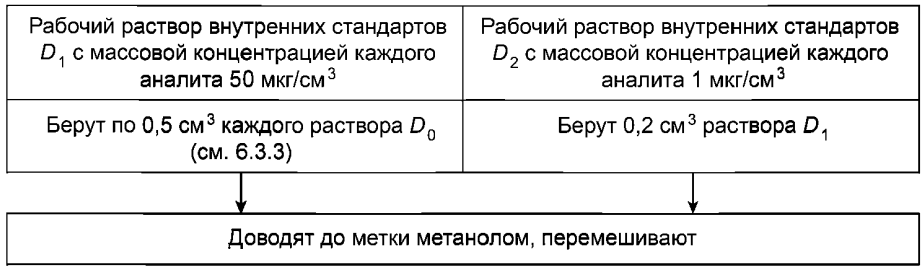

Рисунок 2 — Приготовление рабочих растворов внутренних стандартов D_1, D_2

Растворы D_1, D_2 хранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С. Срок хранения раствора D_1 — не более одного года, 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 G_1—G_4

Матричные градуировочные растворы G_1—G_4 готовят в полипропиленовых пробирках вместимостью 50 см^3 из «чистых» проб массой 5,00 г, в которые вносят рабочий раствор внутренних стандартов D_2 (см. 6.3.4) и рабочий раствор определяемых аналитов C_3 (см. 6.3.2) объемом в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_4

Обозначение и массовая концентрация приготовляемого матричного градуировочного раствора	Концентрация в пересчете на исследуемый образец, мкг/кг	Вносимый объем рабочего раствора, см^3	
		C_3	D_2
G_1 (2,5 нг/см^3)	0,5	0,025	0,1
G_2 (10 нг/см^3)	2,0	0,100	0,1
G_3 (20 нг/см^3)	4,0	0,200	0,1
G_4 (40 нг/см^3)	8,0	0,400	0,1

Пробирки встряхивают в шейкере 1 мин, выдерживают в темноте при комнатной температуре в течение 10 мин и проводят дальнейшую обработку проб согласно разделу 7, указанную на рисунке 3.

Растворы G_1—G_4 используют свежеприготовленными.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб мяса, печени, почек — по ГОСТ 7269.

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

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

7.2 Подготовка проб мяса, печени, почек, включая мясо и печень птицы

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. Обработку анализируемой пробы проводят в соответствии с рисунком 3.

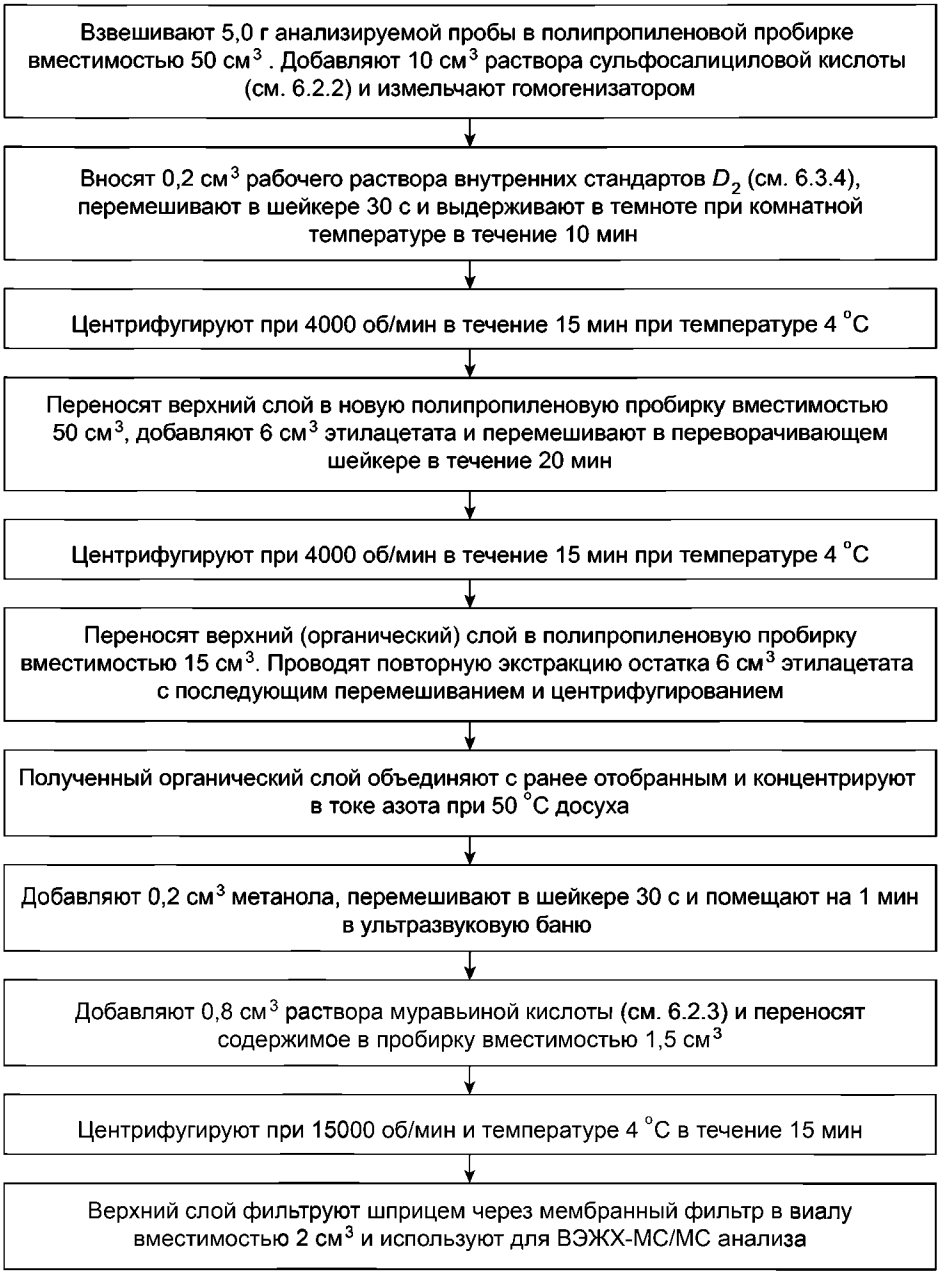

Рисунок 3 — Подготовка проб мяса, печени, почек, включая мясо и печень птицы

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия хроматографических 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 Например, для колонки диаметром 2 мм, длиной 150 мм, с обращеннофазным сорбентом С18 с размером частиц не более 5,0 мкм соблюдают следующие условия хроматографирования:

- температура колонки — 40 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,25 см^3/мин;
- температура в отсеке устройства ввода проб — 10 °С;
- объем вводимой пробы — 40 мм^3.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление подвижных фаз А и Б по 6.2.1) в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 — Условия градиентного элюирования

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %
0,0	100	—
1,4	100	—
37,0	30	70
37,1	100	—
46,0	100	—

8.1.3 Параметры воздействия на ионы в режиме мониторинга множественных реакций (*MRM*) приведены в таблице 4.

Таблица 4 — Параметры воздействия на ионы в режиме *MRM* при ионизации электрораспылением с регистрацией положительных ионов

Аналит	Ион-предшественник *m/z*	Ион-продукт *m/z*	
Хиноксалин-2-карбоновая кислота	175	131	129
3-Метилхиноксалин-2-карбоновая кислота	189	145	92
1,4-Бисдезоксикарбадокс	231	199	143
Хиноксалин-2-карбоновая кислота-D4*	179	133	151
1,4-Бисдезоксикарбадокс-D3*	234	199	143
* Внутренний стандарт.			

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

8.1.4 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора:
- температура источника — 500 °С;
- напряжение на распыляющем капилляре (IS) — 4500 В;
- разрешение квадруполей Q1/Q3 — единичное.

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

8.1.5 Контроль чувствительности хромато-масс-спектрометра осуществляют введением в инжектор хроматографа 40 мм^3 градуировочных растворов G_2 и G_3 (см. 6.3.5) в зависимости от типа анализируемой матрицы. Полученное соотношение сигнал/шум для каждого аналита должно быть не менее трех к одному.

8.2 Построение градуировочной характеристики

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

8.2.1 Проводят измерения не менее трех градуировочных растворов, приготовленных по 6.3.5, в порядке возрастания их концентраций.

8.2.2 Вычисление площади пика проводят для каждого иона-продукта анализируемых метаболитов карбадокса и олаквиндокса и их внутренних стандартов. Допускается проведение количественных измерений по одному, наиболее интенсивному, иону-продукту.

8.2.3 При построении градуировочной характеристики используют линейную регрессию (прямая должна проходить через ноль), при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

8.2.4 Построение линейного градуировочного графика и расчет концентрации метаболитов карбадокса и олаквиндокса в анализируемых пробах выполняется системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.3 ВЭЖХ-МС/МС измерение

8.3.1 Для определения содержания аналитов проводят ВЭЖХ-МС/МС анализ в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования.

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

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

8.3.3 В инжектор хроматографа вводят 40 мм^3 пробы, подготовленной в соответствии с разделом 7, и проводят измерения.

8.3.4 Определяют и регистрируют на хроматограмме время удерживания пиков двух ионов-продуктов каждого аналита, соответствующее времени удерживания, найденному при измерении градуировочных растворов.

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 концентрации аналитов в анализируемой пробе.

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

$$X_i = \frac{C_i V}{m}, \quad (2)$$

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

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

m — масса анализируемой пробы, г.

9.3 Расхождение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) r, приведенного в таблице 5 при доверительной вероятности $P = 0,95$. В случае превышения предела повторяемости r полученные результаты отбрасывают и вновь проводят параллельное измерение.

За окончательный результат содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса принимают среднеарифметическое значение результатов вычислений двух параллельных измерений, выполненных в условиях повторяемости, округленное до первого десятичного знака и выраженное в микрограммах на килограмм (мкг/кг).

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение определения содержания метаболитов карбадокса и олаквиндокса с расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата $k = 2$, указанной в таблице 5.

Таблица 5 — Показатели качества метода

Наименование аналита	Диапазон измерений содержания аналита, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности $\pm U_r$, %, при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) U_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) U_R, %	Предел повторяемости r, % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
Хиноксалин-2-карбоновая кислота	От 0,5 до 1,0 включ.	64	15	31	42
	Св. 1,0 до 8,0 включ.	40	8	19	22

Окончание таблицы 5

Наименование аналита	Диапазон измерений содержания аналита, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности $\pm U_i$, %, при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) U_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) U_R, %	Предел повторяемости r, % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
3-метилхиноксалин-2-карбоновая кислота	От 0,5 до 1,0 включ.	45	14	21	39
	Св. 1,0 до 8,0 включ.	40	11	17	30
1,4-бисдезоксикарбадокс	От 0,5 до 1,0 включ.	60	14	28	39
	Св. 1,0 до 4,0 включ.	35	8	15	22
	Св. 4,0 до 8,0 включ.	22	6	9	17

11 Оформление результатов измерений

Содержание i-го метаболита карбадокса или олаквиндокса, мкг/кг, представляют в виде

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

где $\overline{X}_i$ — среднеарифметическое значение результатов вычислений двух параллельных измерений содержания i-го аналита в анализируемой пробе по 9.2, мкг/кг;

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

12 Контроль стабильности результатов измерений

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

УДК 637:614.3:006.354 МКС 67.050
67.120

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, остаточное содержание, метаболиты карбадокса и олаквиндокса, метод определения содержания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Редактор *А.Э. Попова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 16.11.2016. Подписано в печать 20.12.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68. Тираж 41 экз. Зак. 3233.
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