ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57024— 2016

РЫБА

Метод определения остаточного содержания производных бензоилмочевины с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 300 «Рыбные продукты пищевые, кормовые, технические и упаковка»

3 УТВЕРЖДЕН приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 августа 2016 г. № 913-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 16 Федерального закона «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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

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 производных бензоилмочевины . . . 4
7 Отбор и подготовка проб . . . 6
7.1 Отбор проб . . . 6
7.2 Подготовка проб . . . 6
8 Порядок выполнения анализа . . . 7
8.1 Условия хроматографических измерений . . . 7
8.2 Построение градуировочной характеристики . . . 9
8.3 СВЭЖХ-ВПМС/МС-измерение . . . 10
9 Обработка результатов измерений . . . 10
10 Метрологические характеристики . . . 11
11 Оформление результатов измерений . . . 11
12 Контроль стабильности результатов измерений . . . 11

Поправка к ГОСТ Р 57024—2016 Рыба. Метод определения остаточного содержания производных бензоилмочевины с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 4.5	- температура окружающего воздуха . . . от 20 до 30 ºС;	- температура окружающего воздуха . . . от 15 ºС до 30 ºС;
	- 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.)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РЫБА

Метод определения остаточного содержания производных бензоилмочевины с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения

Fish.
Method for determination of the residual content of derivatives benzoylureas using ultra highly liquid chromatography — quadrupole-time-of-flight mass spectrometry

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на рыбу и устанавливает метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения (далее — СВЭЖХ-ВПМС/МС) для определения остаточного содержания производных бензоилмочевины в диапазоне измерений для дифлубензурона (ДФБ) от 0,5 до 20,0 мкг/кг, тефлубензурона (ТФБ) от 1 до 20 мкг/кг, эмамектина (Эма) от 5 до 200 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

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

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

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

ГОСТ 2603 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 5848 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

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

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

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 ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячно издаваемого информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год.

Издание официальное

Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Количественное определение остаточного содержания производных бензоилмочевины (аналитов) проводят методом внутреннего стандарта по площадям пиков идентифицированных соединений с помощью градуировочной характеристики сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения в режиме широкодиапазонного соударения индуцированных диссоциаций (СВЭЖХ-ВПМС/МС).

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 работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

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

4.3 Приготовление градуировочных растворов проводят в вытяжном шкафу.

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

4.5 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... от 20 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 производных бензоилмочевины применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности ± 0,001 г;
- весы микроаналитические с наибольшим пределом взвешивания 80 г, пределом абсолютной допускаемой погрешности не более ± 0,01 мг;
- масс-спектрометр с времяпролетным детектором высокого разрешения и диапазоном измерений от 50 до 3000 атомных единиц массы (а. е. м.), массовым разрешением не менее 3000, точностью измерения массы не менее 0,5 а. е. м., режимом получения ионов фрагментов;
- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 $дм^3$;
- встряхиватель (шейкер) вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2500 об/мин;
- встряхиватель (шейкер) переворачивающий орбитального типа с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об/мин;
- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;
- камеру лабораторную морозильную с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 20 °С до минус 40 °С;
- колонку хроматографическую длиной 50 мм и диаметром 1 мм с обращеннофазным сорбентом, диаметром частиц сорбента не более 1,7 мкм;

- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;
- компрессор воздушный;
- систему сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографическую, состоящую из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до (50 ± 1) °С;
- систему получения деионизованной воды высокой чистоты;
- систему упаривания растворителей закрытого типа, обеспечивающую поддержание температуры не менее 50 °С;
- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 до 5 °С;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 15 000 об/мин и диапазоном температур от 4 до 25 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 $см^3$ и микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 $см^3$;
- шкаф сушильный лабораторный с рабочим диапазоном температур от 50 до 200 °С;
- картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 $см^3$, заполненные 60 мг сбалансированного гидрофильно-липофильного сорбента с размерами частиц от 30 до 60 мкм;
- пробы, не содержащие производных бензоилмочевины, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8 («чистые» пробы)[1)];
- фильтры нейлоновые мембранные с размером диаметра пор не более 0,2 мкм;
- виалы (флаконы) стеклянные для автоматического устройства ввода проб вместимостью 2 $см^3$ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм;
- колбы 1-10(1000)-1 по ГОСТ 1770;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 20—100 $мм^3$, 200—1000 $мм^3$, 500—5000 $мм^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 $см^3$, 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками;
- конические микроцентрифужные пробирки с крышкой вместимостью 1,5 $см^3$;
- шприцы одноразовые вместимостью 2 $см^3$;
- цилиндры 1-25 (500,1000)-1 по ГОСТ 1770.

5.2 При определении остаточного содержания производных бензоилмочевины применяют следующие реактивы:

- ацетон по ГОСТ 2603;
- ацетонитрил для ВЭЖХ-МС с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- кислоту муравьиную по ГОСТ 5848, ч. д. а.;
- метанол по ГОСТ 6995, х. ч.;
- оксид алюминия, нейтральный для колоночной хроматографии с размером зерна от 0,050 до 0,2 мм;
- воду деионизованную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709.

5.3 При определении остаточного содержания производных бензоилмочевины в качестве образцов сравнения применяют следующие соединения:

1) Для приготовления исходных растворов с массовой долей основного вещества:

- дифлубензурон — не менее 98 %;
- тефлубензурон — не менее 90 %;
- эмамектин — не менее 95 %.

2) Для приготовления исходных растворов внутренних стандартов с массовой долей основного вещества:

- дифлубензурон-*D*4 — не менее 95 %;
- эприномектин — не менее 90 %.

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.

[1)] Срок хранения «чистых» проб при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С — не более 3 мес.

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: метанолом (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 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 $А_1$ и $Б_1$ для СВЭЖХ при отрицательном режиме ионизации

6.2.1.1 В качестве подвижной фазы $А_1$ используют деионизованную воду.

6.2.1.2 В качестве подвижной фазы $Б_1$ используют ацетонитрил.

6.2.2 Приготовление подвижных фаз $А_2$ и $Б_2$ для СВЭЖХ при положительном режиме ионизации

6.2.2.1 Для приготовления подвижной фазы $А_2$ в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ приливают 999 $см^3$ деионизованной воды, добавляют 1 $см^3$ муравьиной кислоты, перемешивают.

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

6.2.2.2 Для приготовления подвижной фазы $Б_2$ в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ приливают 499 $см^3$ ацетонитрила, 500 $см^3$ метанола, добавляют 1 $см^3$ муравьиной кислоты.

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

6.2.3 Приготовление вспомогательного раствора метанола с деионизованной водой в объемном соотношении 1 : 1 (ВР1)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 $см^3$ вносят 25 $см^3$ метанола и 25 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают.

6.2.4 Приготовление вспомогательного раствора ацетонитрила с деионизованной водой в объемном соотношении 1 : 1 (ВР2)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 $см^3$ вносят 25 $см^3$ ацетонитрила и 25 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают.

Срок хранения вспомогательных растворов при комнатной температуре — не более 1 нед.

6.3 Приготовление градуировочных растворов производных бензоилмочевины

Для приготовления исходных растворов веществ C_0 с концентрацией 500 мкг/$см^3$ рассчитывают навеску m, эквивалентную 5,0 мг дифлубензурона, тефлубензурона и эмамектина, исходя из массовой доли в исходном веществе по формуле (1), после чего переносят каждое вещество по отдельности в мерные колбы вместимостью 10 $см^3$. Доводят до метки метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

$$m = m_0 \frac{M_0 \cdot 100\%}{M \cdot c}, \quad (1)$$

где m_0 — масса основного вещества, г;

M_0 — молярная масса соли анализируемого соединения (для анализируемых соединений, растворы которых готовят из солей), г/моль;

M — молярная масса анализируемого соединения, г/моль;

c — массовая доля анализируемого соединения в исходном веществе, %.

6.3.1 Приготовление исходных растворов C_0 дифлубензурона, тефлубензурона, эмамектина ($C_{0Дфб}$, $C_{0Тфб}$, $C_{0Эма}$)

Для приготовления исходных растворов C_0 концентрации 500 мкг/$см^3$ берут навески дифлубензурона, тефлубензурона, эмамектина в пересчете на 5 мг чистого вещества по формуле 1.

Каждое вещество переносят по отдельности в мерные колбы вместимостью 10 см^3, дифлубензурон и тефлубензурон доводят до метки ацетоном, а эмамектин — метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

Срок хранения растворов при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С — не более 1 года.

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

6.3.2 Приготовление рабочих растворов дифлубензурона, тефлубензурона, эмамектина

6.3.2.1 Приготовление рабочих растворов $C_{1Дфб}$, $C_{1Тфб}$, $C_{1Эма}$

Для приготовления рабочих растворов $C_{1Дфб}$, $C_{1Тфб}$, $C_{1Эма}$ концентрации 50 мкг/см^3 в мерные колбы вместимостью 10 см^3 вносят по отдельности по 1 см^3 $C_{0Дфб}$, $C_{0Тфб}$, $C_{0Эма}$ и доводят до метки колбы с $C_{1Дфб}$, $C_{1Тфб}$ — ацетоном, колбу с $C_{1Эма}$ — метанолом. Перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

6.3.2.2 Приготовление рабочего раствора C_2

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят по 1 см^3 $C_{1Дфб}$ и $C_{1Тфб}$, доводят до метки ацетоном, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

Концентрация дифлубензурона, тефлубензурона в растворе C_2 — 5 мкг/см^3.

6.3.2.3 Приготовление рабочего раствора C_3

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 0,2 см^3 C_2 (см. 6.3.2.2) и 0,2 см^3 $C_{1Эма}$ (см. 6.3.2.1), доводят до метки метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

Концентрация дифлубензурона, тефлубензурона в растворе C_3 — 0,1 мкг/см^3, эмамектина — 1 мкг/см^3.

6.3.2.4 Приготовление рабочего раствора C_4

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1 см^3 раствора C_3 (см. 6.3.2.3), доводят до метки метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

Концентрация дифлубензурона, тефлубензурона в растворе C_4 — 0,01 мкг/см^3, эмамектина — 0,1 мкг/см^3.

Растворы хранят при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С.

Срок годности растворов $C_{1Дфб}$, $C_{1Тфб}$, $C_{1Эма}$ — не более 1 года, C_2—C_4 — не более 6 мес.

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

6.3.3 Приготовление исходных растворов D_0 внутренних стандартов дифлубензурона-*D*4 и эприномектина ($D_{0Диф}$, $D_{0Эпр}$)

Для приготовления исходных растворов внутренних стандартов D_0 концентрации 500 мкг/см^3 взвешивают 0,005 г дифлубензурона-*D*4, 0,005 г эприномектина. Каждое вещество переносят по отдельности в мерные колбы вместимостью 10 см^3. Дифлубензурон-*D*4 доводят до метки ацетоном, эприномектин — метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

Срок хранения растворов при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С — не более 1 года.

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

Внутренние стандарты для производных бензоилмочевины выбирают в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Соответствие между аналитами и внутренними стандартами

Наименование аналита	Наименование внутреннего стандарта
Дифлубензурон	Дифлубензурон-*D*4
Тефлубензурон	
Эмамектин	Эприномектин

6.3.4 Приготовление рабочих растворов внутренних стандартов

6.3.4.1 Приготовление рабочих растворов $D_{1Диф}$, $D_{1Эпр}$

Для приготовления рабочих растворов $D_{1Диф}$ и $D_{1Эпр}$ концентрации 50 мкг/см^3 в мерные колбы вместимостью 10 см^3 вносят по отдельности по 1 см^3 $D_{0Диф}$, $D_{0Эпр}$ (см. 6.3.3) и доводят до метки колбу с $D_{1Диф}$ — ацетоном, колбу с $D_{1Эпр}$ — метанолом. Перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

6.3.4.2 Приготовление рабочего раствора $D_{2Диф}$

Для приготовления рабочего раствора $D_{2Диф}$ концентрации 5 мкг/см^3 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1 см^3 $D_{1Диф}$ (см. 6.3.4.1) и доводят до метки метанолом. Перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

6.3.4.3 Приготовление рабочего раствора D_3

Для приготовления рабочего раствора D_3 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 0,2 см^3 $D_{2Диф}$ (см. 6.3.4.2) и 1,6 см^3 $D_{1Эпр}$ (см. 6.3.4.1), доводят до метки метанолом. Перемешивают и помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин.

Растворы хранят при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С.

Срок хранения растворов $D_{1\ Диф}$, $D_{1Эпр}$ не более 1 года, растворов $D_{2\ Диф}$, D_3 — 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_6

Матричные градуировочные растворы G_1 — G_6 готовят в полипропиленовых пробирках вместимостью 15 см^3 из чистых проб массой 1,0 г, в которые вносят рабочий раствор внутренних стандартов и рабочий раствор определяемых аналитов в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1 — G_6

Обозначение и массовая концентрация приготовляемого матричного градуировочного раствора (в соотношении Дфб,Тфб/Эма)	Вносимый объем рабочего раствора, см^3		
	C_3 (6.3.2.3)	C_4 (6.3.2.4)	D_3 (6.3.4.3)
G_1 (20/200 нг/см^3)	0,2	—	0,05
G_2 (10/100 нг/см^3)	0,1	—	0,05
G_3 (5/50 нг/см^3)	0,05	—	0,05
G_4 (2/20 нг/см^3)	0,02	—	0,05
G_5 (1/10 нг/см^3)	—	0,1	0,05
G_6 (0,5/5 нг/см^3)	—	0,05	0,05

Пробирки встряхивают в шейкере 1 мин. и проводят последующую обработку образца согласно разделу 7.

Растворы G_1 — G_6 хранят при температуре от 2 до 4 °С. Срок хранения — не более 1 сут.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб рыбы — по ГОСТ 31339.

7.1.2 Отобранные пробы при отсутствии возможности испытания в день отбора замораживают и хранят при температуре минус 25 °С до проведения исследования, но не более 90 сут.

7.2 Подготовка проб

7.2.1 Экстракция проб

Пробу мышечной ткани измельчают на гомогенизаторе. Далее обработку проводят в соответствии с рисунком 1.

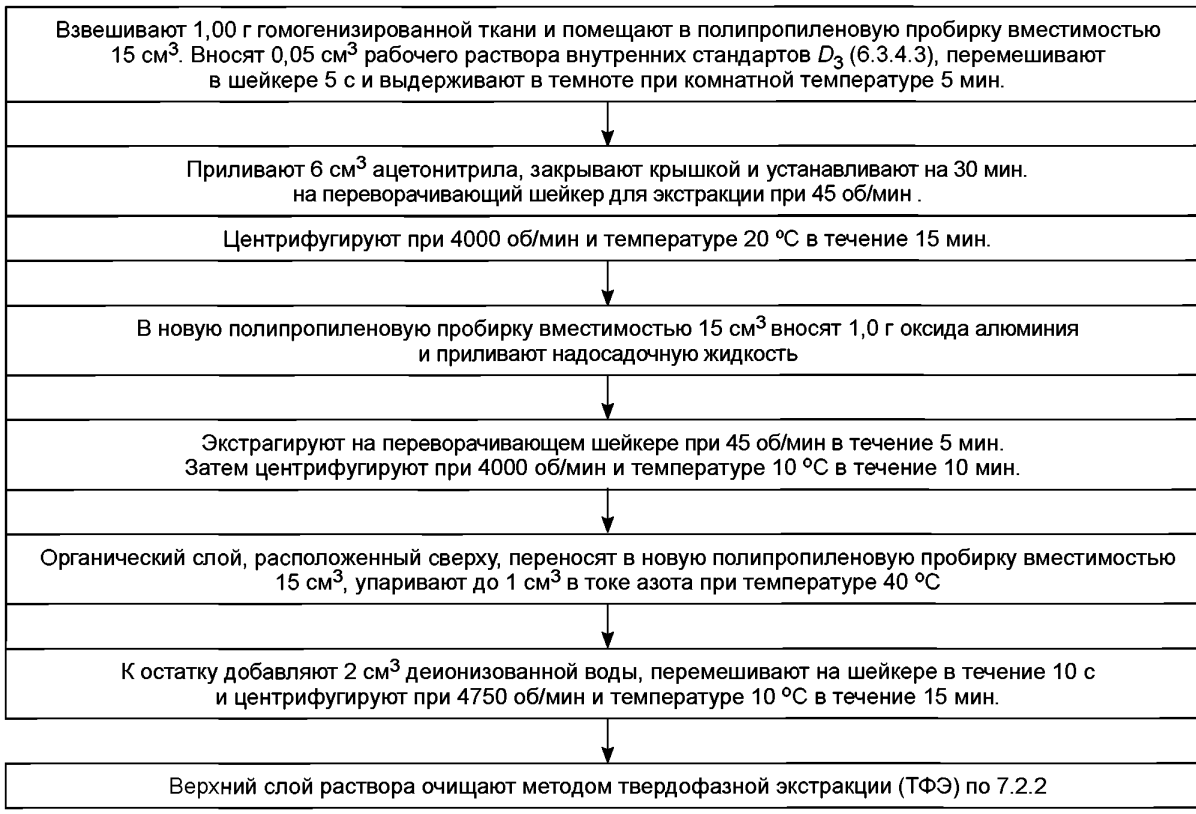


Рисунок 1 — Экстракция проб

7.2.2 Очистка подготовленных проб методом ТФЭ

Для очистки подготовленных проб используют картридж, установленный в блок вакуумного устройства, предварительно активированный 2 см^3 метанола и уравновешенный 2 см^3 деионизированной воды. Пропускают через картридж пробу, полученную в соответствии с 7.2.1. Промывают картридж, последовательно пропуская 2 см^3 деионизированной воды, 3 см^3 вспомогательного раствора ВР1 (6.2.3) и сушат его в вакууме компрессора. Элюируют определяемые вещества в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см^3 с помощью 3 см^3 ацетонитрила. Упаривают элюат досуха при температуре 40 °С. Перерастворяют в 1 см^3 вспомогательного раствора ВР2 (6.2.4), перемешивают на шейкере вортексного типа, помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 5 мин. и снова перемешивают.

Содержимое переливают в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют в течение 20 мин. при 15000 об/мин при температуре 10 °С. При необходимости фильтруют шприцем через мембранный фильтр в виалу для СВЭЖХ-ВПМС/МС-анализа.

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия хроматографических измерений

8.1.1 Масс-спектрометр включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры, рекомендуемые изготовителем хроматографических колонок. Например, для колонки диаметром 1 мм, длиной 50 мм, с обращеннофазным сорбентом и размером частиц 1,7 мкм применяют следующие хроматографические условия:

- температура колонки — 30 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,1 см^3/мин;
- объем вводимой пробы — 10 мм^3;
- температура в отсеке устройства ввода проб — 20 °С.

8.1.2 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление растворов элюентов в соответствии с 6.2.1).

8.1.3 Хроматографическое разделение в отрицательном режиме ионизации

8.1.3.1 Условия хроматографического разделения в отрицательном режиме ионизации приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Условия хроматографического разделения в отрицательном режиме ионизации

Время, мин	Подвижная фаза «$А_1$», %	Подвижная фаза «$Б_1$», %
0,0	50	50
1,0	50	50
4,0	—	100
8,0	—	100
8,1	50	50
15,0	50	50

8.1.3.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора в отрицательном режиме ионизации:

- напряжение в источнике — 400 В;
- напряжение на капилляре — 1000 В;
- давление азота в распылителе — 400 кПа;
- скорость газа осушения — 4 $дм^3$/мин;
- температура газа осушения — 200 °С;
- температура распылителя — 350 °С;
- высокочастотное напряжение на воронке — 400 В;
- амплитуда напряжения ВЧ — 400 В;
- амплитуда напряжения ВЧ ячейки соударений — 550 В.

8.1.3.3 Параметры источника электрораспыления в отрицательном режиме ионизации приведены в таблице 4.

Таблица 4 — Параметры источника электрораспыления

Временной интервал, мин	Амплитуда напряжения ВЧ охладителя ионов, Vpp	Время транспортирования, мкс	Время накопления ионов, мкс	Скорость сканирования/режим сканирования
0,5—7,0	45—55 1/1	35—40 1/1	12	2 Гц/bbCID

8.1.3.4 Параметры воздействия на ионы в режиме широкодиапазонного соударения индуцированных диссоциаций (bbCID) приведены в таблице 5.

Таблица 5 — Параметры работы масс-спектрометра в режиме bbCID

Аналит	Ион предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	Время удерживания, мин	Энергия соударений, эВ
Тефлубензурон	378,967	338,957/358,964	4,3 ± 0,2	13-10 1/1
Дифлубензурон	309,024	289,019	3,6 ± 0,2	13-10 1/1
Дифлубензурон-*D*4	313,024	293,044	3,6 ± 0,2	13-10 1/1

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

8.1.4 Хроматографическое разделение в положительном режиме ионизации

8.1.4.1 Условия хроматографического разделения в положительном режиме ионизации приведены в таблице 6.

Таблица 6 — Условия хроматографического разделения в положительном режиме ионизации

Время, мин	Подвижная фаза «$А_2$», %	Подвижная фаза «$Б_2$», %
0,0	70	30
1,0	70	30
1,1	20	80
2,0	20	80
3,0	—	100
7,0	—	100
7,1	70	30
15,0	70	30

8.1.4.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора в положительном режиме ионизации по 8.1.3.2 кроме параметра:

- амплитуда напряжения ВЧ ячейки соударений — 600 В.

8.1.4.3 Параметры источника электрораспыления в положительном режиме ионизации приведены в таблице 7.

Таблица 7 — Параметры источника электрораспыления

Временной интервал, мин	Амплитуда напряжения ВЧ охладителя ионов, Vpp	Время транспортирования, мкс	Время накопления ионов, мкс	Скорость сканирования/режим сканирования
0,5—7	50—150 1/1	45—65 1/1	13	3Гц/bbCID

8.1.4.4 Параметры воздействия на ионы в режиме широкодиапазонного соударения индуцированных диссоциаций (bbCID) приведены в таблице 8.

Таблица 8 — Параметры работы масс-спектрометра в режиме bbCID

Аналит	Ион-предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	Время удерживания, мин	Энергия соударений, эВ
Эмамектин	886,531	152,119/302,195	3,95 ± 0,20	45/50/55 цикл
Эприномектин	936,508	490,276/352,171	4,35 ± 0,20	

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

8.1.5 Контроль чувствительности масс-спектрометра осуществляют введением 10 мм^3 градуировочного раствора G_4 (6.3.5) в инжектор хроматографа. Полученное соотношение сигнал/шум для каждого аналита должно быть не менее 50.

8.2 Построение градуировочной характеристики

Построение и расчет градуировочной характеристики проводят методом внутреннего стандарта в каждой серии анализов с помощью программного обеспечения масс-спектрометра в автоматическом режиме.

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

8.2.2 В целях контроля стабильности градуировочной характеристики вместе с градуировочными растворами проводят дополнительное измерение «чистой» пробы с добавкой анализируемых соединений на градуировочном уровне G_5.

8.2.3 Вычисление площади пика проводят для наиболее интенсивного, дочернего иона анализируемых соединений и их внутренних стандартов. Для подтверждения наличия рассчитывают отношения площади пика двух дочерних ионов для каждого аналита в градуировочном растворе.

8.2.4 При построении градуировочной характеристики используют линейную регрессию вида $y = ax$, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

8.2.5 Построение линейного градуировочного графика и расчет концентрации производных бензоилмочевины в анализируемых пробах выполняется системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.3 СВЭЖХ-ВПМС/МС-измерение

8.3.1 Для определения остаточного содержания производных бензоилмочевины проводят СВЭЖХ-ВПМС/МС-анализ в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования в условиях хроматографических измерений с параметрами, указанными в 8.1.

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

- экстракты «чистых» проб, приготовленных по 7.2;
- градуировочные растворы (см. 6.3.5);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

Результаты измерений округляют до первого десятичного знака и выражают в микрограммах на килограмм.

8.3.3 Время удерживания производных бензоилмочевины определяют при анализе градуировочных растворов.

8.3.4 Отклонения относительных ионных интенсивностей в анализируемой пробе от относительных ионных интенсивностей, полученных при анализе градуировочных растворов, не должны превышать значений, указанных в таблице 9.

Таблица 9 — Допустимые отклонения относительных ионных интенсивностей

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

9 Обработка результатов измерений

9.1 В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, проводят 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:

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

где C_i — 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 окончательный результат измерений содержания производных бензоилмочевины принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, 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 измерений содержания производных бензоилмочевины с расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата $k = 2$, указанной в таблице 10.

Таблица 10 — Показатели точности методики при проведении измерений содержания производных бензоилмочевины

Аналит	Диапазон измерений содержания соединений, мкг/кг	Значение относительной раширенной неопределенности ± U при коэффициенте охвата $k = 2$, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
Дифлубензурол	От 0,5 до 5,0 включ.	25	5	10	14
	Св. 5,0 до 20,0 включ.	20	3	8	8
Тефлубензурол	От 1,0 » 5,0 включ.	70	26	33	72
	Св. 5,0 до 20,0 включ.	33	10	15	28
Эмамектин	От 5,0 до 100,0 включ.	80	32	46	73
	Св. 100,0 до 200,0 включ.	55	14	26	39

11 Оформление результатов измерений

Содержание i-го производного бензоилмочевины, мкг/кг, представляют в виде:

$$\overline{X} \pm 0,01 \cdot U_i \cdot \overline{X}, \quad (3)$$

где $\overline{X}$ — среднее арифметическое значение вычислений двух параллельных измерений содержания i-го аналита в анализируемой пробе по 9.2, 9.3, мкг/кг;

U — значение относительной расширенной неопределенности содержания i-го аналита для соответствующего диапазона измерений, % (в соответствии с таблицей 10).

12 Контроль стабильности результатов измерений

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

УДК 639.38:614.31:543.06:006.354 ОКС 67.120.30

Ключевые слова: рыба, производные бензоилмочевины, сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения, дифлубензурон, тефлубензурон, эмамектин

Редактор *Н.Н. Мигунова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Ю.В. Поповой*

Сдано в набор 22.08.2016. Подписано в печать 12.09.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86.

Набрано в ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

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

gost.e-ecolog.ru