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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33607— 2015

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение бета-агонистов методом 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 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 научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 октября 2015 г. № 81-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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 3 марта 2016 г. № 118-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33607—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 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

© 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

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

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение бета-агонистов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Meat and meat products. Determination of beta-agonists using high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо, включая мясо птицы, печень и почки*, а также субпродукты, мясные и мясосодержащие продукты и устанавливает метод измерения (анализа) массового содержания бета-агонистов (кленбутерола, сальбутамола, рактопамина, тербуталина, сальметерола, тулобутерола, циматерола, мабутерола, мапентерола, зилпатерола) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС). Диапазон измерений бета-агонистов составляет от 0,1 до 100,0 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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

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

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

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ 199—78 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия

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

ГОСТ 3760—79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 4025—95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

---

* Настоящий стандарт распространяется на мясо, включая мясо птицы, печень и почки в части определения сальметерола, прочие бета-агонисты в мясе, мясе птицы, печени и почках определяют по ГОСТ 33486—2015.

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

Издание официальное

ГОСТ ИСО 5725-2—2003* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

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

ГОСТ 7702.2.0—95 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьи. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ 9245—79 Потенциометры постоянного тока измерительные. Общие технические условия

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

ГОСТ 9805—84 Спирт изопропиловый. Технические условия

ГОСТ 20469—95 Электромясорубки бытовые. 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 26272—98 Часы электронно-механические кварцевые наручные и карманные. Общие технические требования

ГОСТ 26678—85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 28165—89 Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования

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

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 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **бета-агонисты:** Группа гормональных препаратов, стимулирующих β-адренергические рецепторы и используемых в качестве стимуляторов роста животных (кленбутерол, сальбутамол, рактопамин, тербуталин, сальметерол, тулобутерол, циматерол, мабутерол, мапентерол, зилпатерол).

3.2 **супернатант:** Жидкость, располагающаяся над твердым слоем (осадком, седиментом) после центрифугирования пробы.

3.3 **элюент:** Подвижная фаза (растворитель или смесь растворителей).

3.4 **аналит:** Компонент, искомый или определяемый в пробе.

4 Сущность метода

Метод основан на ферментативном гидролизе пробы, извлечении бета-агонистов смесью изопропилового спирта с этилацетатом и очистке пробы методом твердофазной экстракции (ТФЭ), и последующем ВЭЖХ-МС/МС анализе.

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений».

** 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».

5 Требования безопасности

5.1 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

5.2 Помещение, в котором проводятся измерения, должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

5.3 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Хроматограф жидкостный, укомплектованный:

- трехквадрупольным масс-спектрометрическим детектором с источником ионизации распылением в электрическом поле (*ESI*);
- изократическим насосом;
- хроматографической колонкой для ВЭЖХ длиной 50—150 мм и диаметром 2,1—4,6 мм с обращенной фазой С18 размером частиц 1,8—5,0 мкм;
- блоком термостатирования колонок с поддержанием температуры 40 °С с точностью ±0,1 °С;
- записывающим устройством с компьютерным управлением и автоматической программой обработки хроматографических данных в соответствии с комплектацией хроматографа.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 специального (I) класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,001 г.

pH-метр по ГОСТ 9245 со стеклянным и хлорсеребряным электродами (или комбинированным стеклянным электродом) с диапазоном измерений от 0 до 14 ед. pH, с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 ед.

Баня водяная лабораторная, имеющая диапазон температур от 20 °С до 100 °С с точностью поддержания температуры ±0,5 °С.

Баня ультразвуковая лабораторная.

Вакуумная установка для твердофазной экстракции с регулировкой скорости потока.

Испаритель роторный по ГОСТ 28165.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

Часы электронно-механические по ГОСТ 26272.

Центрифуга лабораторная, с центробежным ускорением 4000 *g*.

Банки стеклянные вместимостью 250—500 $см^3$.

Пипетки градуированные 1-2-1-5, 1-2-1-10 по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования от 1 до 10 $см^3$ и относительной погрешностью дозирования не более ±1 %.

Пробирки центрифужные из полипропилена вместимостью 15 и 50 $см^3$.

Фильтр мембранный из политетрафторэтилена с диаметром пор 0,45 мкм.

Колбы круглодонные К-1-50-29/32 по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 2-500-2 по ГОСТ 1770.

Цилиндр мерный 2-100-1 по ГОСТ 1770.

Колба коническая Кн-1-100(1000)-24/29 ТС по ГОСТ 25336.

Флаконы — виалы хроматографические из темного стекла вместимостью 2,0 $см^3$.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Ацетат натрия по ГОСТ 199, ч. д. а.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, х. ч.

Кислота хлорная, с содержанием основного вещества не менее 70,0 %.

Гидроокись натрия по ГОСТ 4328, х. ч.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.
Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, абсолютированный.
Этилацетат по ГОСТ 22300, х. ч.
Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч. д. а.
Аммиак водный по ГОСТ 3760, х. ч.
Метанол, ос. ч.
Ацетонитрил, ос. ч.
Кленбутерол с содержанием основного вещества не менее 95,0 %.
Сальбутамол с содержанием основного вещества не менее 96,0 %.
Рактопамин с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.
Тербуталин с содержанием основного вещества не менее 98,0 %.
Сальметерол с содержанием основного вещества не менее 98,0 %.
Тулобутерол с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.
Циматерол с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.
Мабутерол с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.
Мапентерол с содержанием основного вещества не менее 99,9 %.
Зилпатерол с содержанием основного вещества не менее 98,0 %.
Картриджи ТФЭ на основе полимерного катионнообменного сорбента*.
Бета-глюкуронидаза из виноградной улитки активностью 1000 ед./см^3**.

7 Отбор проб

7.1 Отбор проб по ГОСТ 9792, ГОСТ 7269, ГОСТ 7702.2.0.

7.2 Пробу измельчают, дважды пропуская через мясорубку с диаметром отверстий решетки 2—4 мм, и тщательно перемешивают.

7.3 Подготовленную пробу помещают в стеклянную банку вместимостью 250—500 см^3 и закрывают крышкой.

Допускается хранить подготовленную пробу в замороженном состоянии без доступа кислорода при температуре не выше минус 18 °С не более 7 сут.

8 Подготовка к измерению

8.1 Приготовление растворов бета-агонистов

8.1.1 Приготовление индивидуальных растворов бета-агонистов с массовой концентрацией 0,1 мг/см^3

Взвешивают 5,0 мг индивидуального бета-агониста (кленбутерола, сальбутамола, рактопамина, тербуталина, сальметерола, тулобутерола, циматерола, мабутерола, мапентерола, зилпатерола), переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят до метки метанолом.

Растворы хранят в холодильнике при температуре минус (18 ± 2) °С в течение месяца.

8.1.2 Приготовление градуировочных растворов бета-агонистов

Для определения бета-агонистов из индивидуальных растворов массовой концентрации 0,1 мг/см^3 готовят градуировочные растворы массовой концентрации 1000 нг/см^3 (раствор 1), 500 нг/см^3 (раствор 2), 100 нг/см^3 (раствор 3), 50 нг/см^3 (раствор 4), 10 нг/см^3 (раствор 5).

---

* Примером патрона на основе полимерного катионнообменного сорбента может быть патрон ТФЭ Agilent Bond Elut Plexa PCX 60 mg, 3 mL (№ 12108603). Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования другой аппаратуры с аналогичными свойствами.

** Примером ферментативного препарата на основе бета-глюкуронидазы может быть β-Glucuronidase from Helixpomatia (SigmaG8885) CAS 9001-45-0. Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования другого препарата с аналогичными свойствами.

Для приготовления раствора 1 градуированной пипеткой в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$ переносят соответственно по 1 $см^3$ индивидуального раствора бета-агониста и доводят до метки 1 %-ным раствором муравьиной кислоты (см. 8.2.8).

Для приготовления градуировочного раствора 2 в хроматографическую виалу переносят 0,5 $см^3$ градуировочного раствора 1 и 0,5 $см^3$ 1 %-ного раствора муравьиной кислоты (см. 8.2.8).

Для приготовления градуировочного раствора 3 в хроматографическую виалу переносят 0,1 $см^3$ градуировочного раствора 1 и 0,9 $см^3$ 1 %-ного раствора муравьиной кислоты (см. 8.2.8).

Для приготовления градуировочного раствора 4 в хроматографическую виалу переносят 0,5 $см^3$ градуировочного раствора 3 и 0,5 $см^3$ 1 %-ного раствора муравьиной кислоты (см. 8.2.8).

Для приготовления градуировочного раствора 5 в хроматографическую виалу переносят 0,1 $см^3$ градуировочного раствора 3 и 0,9 $см^3$ 1 %-ного раствора муравьиной кислоты (см. 8.2.8).

Растворы хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение 7 сут.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление раствора ацетата натрия молярной концентрации $c(C_2H_3O_2Na)$ = = 0,2 моль/$дм^3$ (pH = 5,2)

Взвешивают 1,64 г ацетата натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде, доводя объем до метки. По каплям добавляют концентрированную уксусную кислоту, доводя pH до 5,2, контролируя pH-метром. Раствор помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$.

8.2.2 Приготовление раствора хлорной кислоты молярной концентрации $c(HClO_4)$ = = 0,1 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ приливают 30—40 $см^3$ дистиллированной воды и добавляют 0,43 $см^3$ хлорной кислоты (c = 70 %, ρ = 1,67 г/$см^3$), доводят объем до метки дистиллированной водой.

8.2.3 Приготовление раствора гидроксида натрия молярной концентрации $c(NaOH)$ = = 10,0 моль/$дм^3$

Взвешивают 20,0 г гидрооксида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде, доводя объем до метки.

8.2.4 Приготовление раствора хлорида натрия молярной концентрации $c(NaCl)$ = = 3,0 моль/$дм^3$

Взвешивают 17,53 г хлорида натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде, доводя объем до метки.

8.2.5 Приготовление раствора изопропилового спирта с этилацетатом (60:40)

В коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$ с помощью мерного цилиндра приливают 60 $см^3$ изопропилового спирта и 40 $см^3$ этилацетата.

8.2.6 Приготовление 2 %-ного раствора муравьиной кислоты в дистиллированной воде

В мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ приливают 40 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 1 $см^3$ муравьиной кислоты, перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой.

8.2.7 Приготовление 5 %-ного раствора аммиака в метаноле

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ приливают 90 $см^3$ метанола, добавляют 5 $см^3$ аммиака, перемешивают и доводят объем до метки метанолом.

8.2.8 Приготовление 1 %-ного раствора муравьиной кислоты с метанолом (90:10)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ приливают 60—70 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 1 $см^3$ муравьиной кислоты и 10 $см^3$ метанола, перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой.

8.2.9 Приготовление подвижной фазы хроматографической системы

Для проведения хроматографического анализа используется двухкомпонентная подвижная фаза:

- элюент А: 1 %-ный раствор муравьиной кислоты в дистиллированной воде.

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ приливают 450 $см^3$ дистиллированной воды и добавляют 5 $см^3$ муравьиной кислоты, перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой;

- элюент В: смесь ацетонитрила с метанолом (1:1)

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ приливают по 250 $см^3$ ацетонитрила и метанола, раствор перемешивают.

Перед проведением анализа элюенты дегазируют на ультразвуковой бане.

Готовые растворы хранят в конических колбах с притертыми пробками вместимостью 1000 см^3, при температуре (4 ± 2) °С не более месяца.

8.3 Подготовка пробы

8.3.1 Выделение бета-агонистов из продукта

Пробу массой 5 г, взвешенную с точностью до 0,01 г, помещают в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3. Добавляют 20 см^3 раствора ацетата натрия активной кислотностью 5,2 ед. pH, и тщательно перемешивают. Добавляют 0,250 см^3 бета-глюкорнидазы, перемешивают и ставят на водяную баню при температуре 37 °С на 16 ч.

Гидролизат центрифугируют 5 мин с центробежным ускорением 4000 *g*. Далее 4 см^3 супернатанта отбирают в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3, добавляют 5 см^3 раствора хлорной кислоты, доводят pH концентрированной хлорной кислотой до (1 ± 0,3) ед. pH. Затем пробу центрифугируют вт ечение 10 мин. Супернатант переносят в пробирку вместимостью 50 см^3, доводя pH до 11 раствором гидроксида натрия. В пробирку добавляют 10 см^3 раствора хлорида натрия и 10 см^3 смеси изопропилового спирта с этилацетатом, перемешивают, центрифугируют 5 мин. Органический слой изопропилового спирта с этилацетатом переносят в круглодонную колбу. Экстракцию повторяют дважды, экстракты объединяют и упаривают на роторном испарителе при 40 °С. Сухой остаток растворяют в 5 см^3 раствора ацетата натрия активной кислотностью 5,2 ед. pH, и проводят процедуру твердофазной экстракции (ТФЭ).

8.3.2 Очистка пробы методом ТФЭ

Картриджи ТФЭ предварительно активируют, пропуская 3 см^3 метанола, затем 3 см^3 дистиллированной воды. Анализируемый раствор наносят на картридж со скоростью 1 см^3/мин. Картридж промывают, пропуская 2 см^3 дистиллированной воды и 2 см^3 раствора 2 %-ной муравьиной кислоты, отбрасывая смывы. Аналиты элюируют 5 см^3 5 %-ного раствора аммиака в метаноле со скоростью 1 см^3/мин и переносят в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40 °С. К сухому остатку приливают 1 см^3 смеси 1 %-ной муравьиной кислоты с метанолом. Ставят на 5 мин на ультразвуковую баню до полного растворения остатка. Раствор пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм в хроматографическую виалу вместимостью 2 см^3 для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

9 Проведение измерений

9.1 Хроматографические условия измерений

Условия проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа подбираются в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа, масс-спектрометрического детектора и хроматографической колонки.

В качестве примера могут быть приведены следующие условия определения бета-агонистов, выполненные на системе ВЭЖХ-МС/МС с хроматографической колонкой С18, 4,6 × 50 мм, 1,8 мкм.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление растворов элюентов по 8.1.2). Объем вводимой пробы — 0,01 см^3.

Таблица 1 — Параметры и условия ВЭЖХ

Время, мин	Соотношение компонентов подвижной фазы		Скорость потока, см^3/мин	Температура колонки, °С
	А, %	В, %		
0	98	2	0,4	40
0,5	98	2	0,4	40
4	65	35	0,4	40
5	20	80	0,4	40
7	10	90	0,4	40
7,5	98	2	0,4	40
12	98	2	0,4	40

9.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Для анализа подобраны следующие параметры масс-спектрометрического детектирования:

Температура источника — 100 °С;

Температура газа десольвации — 350 °С;

Скорость потока газа десольвации — 5 $дм^3$/мин;

Давление иглы распылителя — 45 *psi* (3,1 Бар).

Условия регистрации аналитических сигналов в режиме мониторинга множественных реакций (*MRM*) представлены в таблице 2.

Условия детектирования оптимизируют в ручном режиме. Для этого используются градуировочные растворы индивидуальных веществ концентрации 1000, 500, 100, 50 и 10 нг/$см^3$, приготовленных по 8.1. При этом, соотношение сигнал/шум (*S/N*) молекулярного иона должно быть не менее 1:10. Напряжение на фрагменторе оптимизируют с шагом 10 *V* по максимальному отклику протонированного молекулярного иона.

Таблица 2 — Параметры воздействия на ионы в режиме *MRM* и условия ионизации распылением в электрическом поле (*ESI*) с регистрацией положительных ионов

Аналит	Молекулярный ион, *m/z*	Дочерние ионы, *m/z*	Напряжение на фрагменторе (*Frag*), В	Энергия диссоциации (*CE*), В
Кленбутерол	277,2	203,1 259,1	100	12 5
Сальбутамол	240,2	148,2 222,1	100	15 5
Рактопамин	302,2	164,2 284,1	110	12 6
Тербуталин	226,1	152,2 170,2	100	12 6
Сальметерол	416,3	380,3 398,4	130	17 10
Тулобутерол	228,1	154,1 172,2	100	12 5
Циматерол	220,1	160,2 202,1	90	12 3
Мабутерол	311,2	237,1 293,2	110	13 7
Мапентерол	325,3	237,1 307,2	110	12 5
Зилпатерол	262,2	244,2 202,2	100	7 17

Энергию диссоциации (*CE*) оптимизируют с шагом 5 *V* по максимальному отклику характерного дочернего иона.

9.3 Градуировка ВЭЖХ-МС/МС системы

Приготовленные по 8.1 градуировочные растворы подвергают ВЭЖХ-МС/МС анализу в условиях, выбранных в соответствии с 9.1—9.2. Проводят по три параллельных измерения для каждой концентрации градуировочных растворов. Полученные хроматограммы обрабатывают с использованием компьютерной системы обработки данных хроматографа. Определяют абсолютное время удерживания бета-агонистов. С использованием средств программного обеспечения строят градуировочную зависимость площади пика бета-агониста, определяемую по сумме двух дочерних ионов, от концентрации аналита в градуировочном растворе.

Коэффициент линейной корреляции полученной градуировочной зависимости должен быть не менее 0,99. При невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Проведение градуировки обязательно при замене хроматографической колонки, а также при систематическом получении неудовлетворительных результатов контроля, выполняемого по разделу 12.

9.4 Контроль аналитической системы

Контроль выполняют с использованием приготовленных по 8.1 градуировочных растворов. Полученный результат анализа не должен отличаться от действительного значения концентрации определяемых веществ в градуировочном растворе более чем на 3 %, относительное стандартное отклонение времени удерживания аналитов — не более чем на 5 %. В случае невыполнения указанного критерия стабильности градуировочной характеристики проводят новую градуировку.

Контроль аналитической системы осуществляется при условиях, указанных в 9.1, 9.2 перед началом проведения измерений, а также при смене хроматографической колонки, чистке блоков аналитического прибора и т. д.

9.5 Выполнение измерений

Для контроля фона прибора, перед началом серии измерений, между анализами проб в хроматограф вводят 2 мм^3 подвижной фазы (А — 98 %,В — 2 %).

В виалы вместимостью 2 см^3 вносят подготовленную пробу по 8.3 и анализируют на системе ВЭЖХ-МС/МС при условиях, указанных в 9.1, 9.2.

По значению площади хроматографического пика с использованием установленной градуировочной характеристики и программы обработки данных находят массовую концентрацию бета-агонистов в анализируемой пробе.

Вычисление массовой доли бета-агонистов в анализируемой пробе экстракта проводят для каждого из двух параллельных определений по формуле (1).

10 Обработка результатов

Идентификацию аналитов осуществляют по абсолютному времени удерживания хроматографических пиков бета-агонистов, регистрируемых в режиме мониторинга множественных реакций (*MRM*). Содержание бета-агонистов определяют по площади хроматографических пиков анализируемых проб.

В соответствие с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, создают таблицу пиков с использованием программного обеспечения. Расчеты содержания соединения и площади пика выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

Вычисление площади пика проводят для двух дочерних ионов (см. таблицу 2) для каждого соединения.

Массовую долю бета-агонистов X, мкг/кг, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_{ст} \cdot \Sigma S_x \cdot V_р}{\Sigma S_{ст} \cdot m}, \quad (1)$$

где $C_{ст}$ — массовая концентрация индивидуального бета-агониста в градуировочном растворе, нг/см^3;

ΣS_x — сумма площадей пиков двух дочерних ионов индивидуального бета-агониста в анализируемой пробе, усл. ед.;

$V_р$ — объем раствора для растворения бета-агонистов после ТФЭ, см^3;

$\Sigma S_{ст}$ — сумма площадей пиков двух дочерних ионов индивидуального бета-агониста в градуировочном растворе, усл. ед.;

m — масса анализируемой пробы, г.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных измерений, округленное до второго десятичного знака.

Примечание — Массовую долю бета-агонистов выражают в мкг/кг, что равнозначно получаемой по формуле (1) размерности нг/г.

11 Метрологические характеристики

11.1 Метрологические характеристики метода при доверительной вероятности P = 0,95 приведены в таблице 3.

Таблица 3

Наименование показателя	Границы относительной погрешности ±δ,%	Предел повторяемости r, мкг/кг	Предел воспроизводимости R, мкг/кг
Кленбутерол	25	$0,20x_{ср}$	$0,30X_{ср}$
Сальбутамол	20	$0,15x_{ср}$	$0,25X_{ср}$
Рактопамин	15	$0,10x_{ср}$	$0,20X_{ср}$
Тербуталин	25	$0,20x_{ср}$	$0,30X_{ср}$
Сальметерол	20	$0,15x_{ср}$	$0,25X_{ср}$
Тулобутерол	20	$0,15x_{ср}$	$0,25X_{ср}$
Циматерол	20	$0,15x_{ср}$	$0,25X_{ср}$
Мабутерол	15	$0,10x_{ср}$	$0,20X_{ср}$
Мапентерол	25	$0,20x_{ср}$	$0,30X_{ср}$
Зилпатерол	20	$0,15x_{ср}$	$0,25X_{ср}$

$x_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, мкг/кг.
$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в разных лабораториях, мкг/кг.

11.2 Расхождение между результатами двух параллельных измерений, выполненных одним оператором при анализе одной и той же пробы с использованием одних и тех же средств измерений и реактивов, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) r, значения которого приведены в таблице 3.

Условия приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, при доверительной вероятности $P = 0,95$, должны удовлетворять условию

$$|x_1 - x_2| \leq r, \quad (2)$$

где x_1 и x_2 — результаты двух параллельных измерений, мкг/кг;
r — предел повторяемости, мкг/кг.

11.3 Расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости R, значения которого приведены в таблице 1.

Условия приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, при доверительной вероятности $P = 0,95$, должны удовлетворять условию

$$|X_1 - X_2| \leq R, \quad (3)$$

где X_1 и X_2 — результаты двух измерений, выполненных в разных лабораториях, мкг/кг;
R — предел воспроизводимости, мкг/кг.

11.4 Границы относительной погрешности, находящиеся с доверительной вероятностью $P = 0,95$, при соблюдении условий настоящего стандарта, не должны превышать значений, приведенных в таблице 3.

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Процедуру контроля стабильности показателей качества результатов измерений (повторяемости, промежуточной прецизионности и погрешности) проводят в соответствии с порядком, установленным в лаборатории, по ГОСТ ИСО 5725-6.

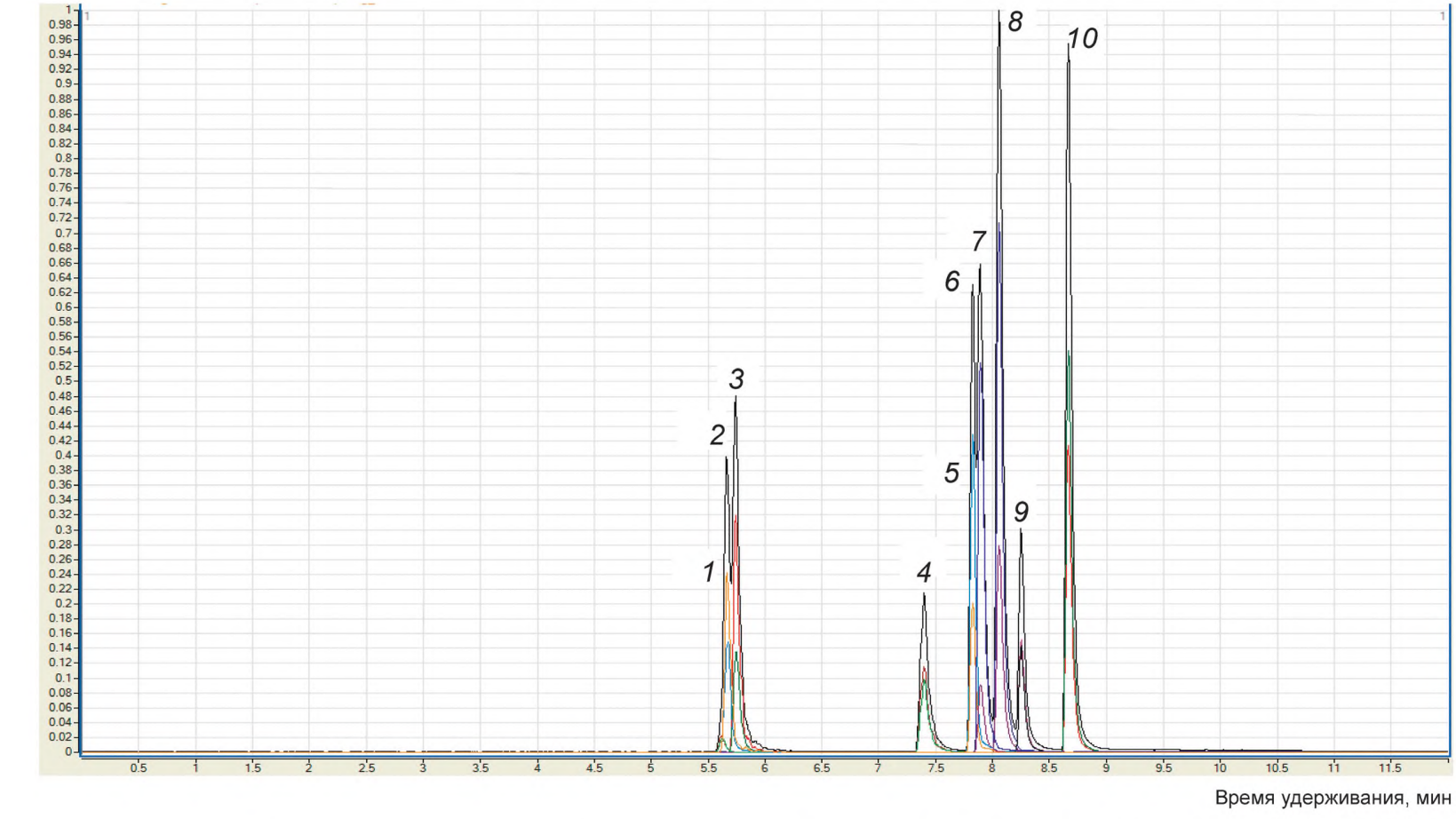
12.2 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости), осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений не должно превышать предела повторяемости (r). Значения r приведены в таблице 3.

12.3 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений, полученными двумя лабораториями, не должно превышать предела воспроизводимости (R). Значения R приведены в таблице 3.

Приложение А
(справочное)

Хроматограмма градуировочных растворов бета-агонистов (общий ионный ток и MRM переходы)

А.1 Хроматограмма градуировочных растворов бета-агонистов (общий ионный ток и *MRM* переходы) приведена на рисунке А.1.



1 — тербуталин; *2* — циматерол; *3* — сальбутамол; *4* — рактопамин; *5* — тулобутерол; *6* — кленбутерол; *7* — мабутерол; *8* — зилпатерол; *9* — мапентерол; *10* — сальметерол

Рисунок А.1

УДК 637.5.04.07:006.354 МКС 67.120.10

Ключевые слова: мясные продукты, бета-агонисты, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором, ТФЭ, ВЭЖХ-МС/МС анализ

Редактор *Д.А. Мезинова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 01.04.2016. Подписано в печать 14.04.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40. Тираж 45 экз. Зак. 1066.

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

gost.e-ecolog.ru