МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
33526—
2015**

МОЛОКО И ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОКА

Методика определения содержания антибиотиков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГБНУ «ВНИМИ»)

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 12 ноября 2015 г. № 82-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 30 ноября 2015 г. № 2085-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33526—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 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

МКС 67.100.10

Поправка к ГОСТ 33526—2015 Молоко и продукты переработки молока. Методика определения содержания антибиотиков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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

(ИУС № 7 2019 г.)

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

МОЛОКО И ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОКА

Методика определения содержания антибиотиков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Milk and dairy products.
Method for determination of the antibiotic by high performance liquid chromatography

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и продукты переработки молока (молоко (сырое, питьевое), сливки (сырые, питьевые), молочные продукты, молокосодержащие продукты, побочные продукты переработки молока, продукцию детского питания на молочной основе, сыр и сырные продукты, масло из коровьего молока и масляную пасту, консервы молочные, мороженое и смеси для мороженого и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии по определению остаточного содержания антибиотиков: левомицетина (хлорамфеникола), пенициллиновой группы, стрептомицина, тетрациклиновой группы.

Диапазон измерений массовых долей антибиотиков для левомицетина (хлорамфеникола) от 0,0001 млн$^{-1}$ (мг/кг) до 1,0 млн$^{-1}$ (мг/кг), для антибиотиков пенициллиновой и тетрациклиновой групп от 0,001 млн$^{-1}$ (мг/кг) до 1,0 млн$^{-1}$ (мг/кг), для стрептомицина от 0,005 млн$^{-1}$ (мг/кг) до 1,0 млн$^{-1}$ (мг/кг).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ ИСО 5725-1—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения[1]

ГОСТ ИСО 5725-6—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике[2]

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

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

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[3]

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

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 908—2004 Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия

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

[1] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002.
[2] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.
[3] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 5848—73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6552—80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 10652—73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, 2-водная (трилон Б). Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

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

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

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. 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 антибиотиков из пробы продукта, очистке экстракта и определении антибиотиков в экстракте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

Хроматограф для проведения ВЭЖХ, включающий следующие элементы:

– колонка хроматографическая обращенно-фазная (250 · 4,6) мм, заполненная силикагелем с диаметром частиц сорбента 3 мкм;

– детектор спектрофотометрический или диодно-матричный с длиной волны детектирования 265 нм и 280 нм с погрешностью задания длины волны ± 1 нм;

– петлевое устройство для ввода пробы с рабочим объемом петли 0,020 $см^3$;

– насос высокого давления;

– регистрирующее устройство, позволяющее проводить измерения площади (или высоты) пика с погрешностью ± 1 %;

– программное обеспечение для статистической обработки полученных результатов измерений.

Устройство вакуумное для твердофазной экстракции.

Картридж для твердофазной экстракции объемом не более 6 $см^3$, заполненный обращенно-фазным сорбентом с диаметром частиц не более 50 мкм.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 или весы по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт, с пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,5 мг и ± 1,0 мг.

Анализатор потенциометрический (pH-метр) с диапазоном измерения 1–14 ед. pH, с пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,01 ед. pH.

Центрифуга лабораторная с охлаждением, обеспечивающая скорость вращения не менее 15000 об/мин и диапазон температур охлаждения от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 $см^3$ и микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 $см^3$.

Модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и максимальной температурой термостатирования 40 °С.

Баня водяная термостатируемая.

Баня ультразвуковая с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 $дм^3$.

Гомогенизатор роторный с четырехлопастным ножом, с угловой скоростью вращения ножей (1000 – 10000) мин$^{-1}$, включающий емкость вместимостью 1,0 дм^3.

Встряхиватель лабораторный (вортекс) вибрационный для пробирок орбитального типа движения с амплитудой вращения гнезда 3 мм и скоростью вращения гнезда (150 – 2500) мин$^{-1}$.

Дозаторы механические переменного объема (0,1–3 мм^3, 0,5–10 мм^3, 20–200) мм^3, 100–1000 мм^3, 1–5 см^3) с наконечниками.

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки 1-1-1-5, 1-1-1-10 по ГОСТ 29227.

Пробирки мерные стеклянные П-1-10-0,1 ХС по ГОСТ 1770.

Цилиндр 1-25-1, 1-100-1, 1-250-2 по ГОСТ 1770.

Виалы (флаконы полипропиленовые) вместимостью 15 см^3 и 50 см^3 с герметично закрывающимися пластмассовыми крышками.

Колба Кн-1-250-24/29, Кн-1-500-24/29 ТС по ГОСТ 25336.

Стакан В-1-100, В-1-500, В-1-1000 ТС по ГОСТ 25336.

Воронка В-56-80 ХС по ГОСТ 25336.

Ступка фарфоровая с пестиком по ГОСТ 9147.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Фильтр нейлоновый с размером пор 0,45 мкм.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а.

Ацетонитрил, ч.д.а.

Бензилпенициллин, массовой долей основного вещества не менее 99 %.

Демеклоциклин, массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Доксициклин, массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Кислота лимонная моногидрат пищевая по ГОСТ 908.

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч.д.а.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552, х.ч.

Метанол для хроматографии (метиловый спирт), х.ч.

Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный по ГОСТ 245, ч.д.а.

Окситетрациклина гидрохлорид, массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б) по ГОСТ 10652, х.ч.

Стрептомицина сульфат, массовой долей основного вещества не менее 96 %.

Тетрациклина гидрохлорид, массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Хлорамфеникол (левомицетин), массовой долей основного вещества не менее 99 %.

Хлортетрациклин гидрохлорид, массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Феноксиметилпенициллин, массовой долей основного вещества не менее 99 %.

Вода для лабораторного анализа деионизированная, с удельным сопротивлением 28 Ом, степень чистоты 2 по ISO 3696.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерения, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

5 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 26809.1, ГОСТ 26809.2, а также другим нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

Если определение не может быть проведено сразу после отбора проб, их хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С не более 48 ч.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Приготовление раствора лимонной кислоты молярной концентрации c ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) = 0,1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают (21,000 ± 0,001) г лимонной кислоты, растворяют в небольшом количестве деионизированной воды и тщательно перемешивают. Объем рас-

твора доводят деионизированной водой до метки.

Раствор хранят при температуре (20 ± 2) °С не более 1 мес.

6.1.2 Приготовление раствора натрия фосфорнокислого молярной концентрации *с* ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) = 0,2 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят (35,600 ± 0,001) г натрия фосфорнокислого, растворяют в небольшом количестве деионизированной воды и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят деионизированной водой до метки.

Раствор хранят при температуре (20 ± 2) °С не более 1 мес.

6.1.3 Приготовление буферного раствора

В конической колбе вместимостью 250 см^3 смешивают 60 см^3 раствора лимонной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм^3 (6.1.1) и 40 см^3 раствора натрия фосфорнокислого молярной концентрации 0,2 моль/дм^3 (6.1.2), добавляют (37,200 ± 0,001) г трилона Б, аккуратно перемешивают и измеряют значение pH полученного раствора. Значение pH должно составлять 4,0. При необходимости значение pH доводят до 4,0 ед.pH ортофосфорной кислотой.

Раствор хранят при температуре (20 ± 2) °С не более 1 мес.

6.1.4 Приготовление растворов элюентов мобильной фазы А и Б

6.1.4.1 Для приготовления раствора элюента мобильной фазы А в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 200 см^3 деионизированной воды, добавляют 5 см^3 муравьиной кислоты и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят деионизированной водой до метки, фильтруют через нейлоновый фильтр.

Раствор хранят при температуре (20 ± 2) °С не более 1 мес.

6.1.4.2 Для приготовления раствора элюента мобильной фазы Б в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 200 см^3 метанола, добавляют 5 см^3 муравьиной кислоты и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят метанолом до метки, фильтруют через нейлоновый фильтр.

Раствор хранят при температуре (20 ± 2) °С не более 1 мес.

6.1.5 Приготовление 50 %-ного раствора метанола

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 25,0 см^3 метанола, добавляют небольшое количество деионизированной воды и тщательно перемешивают. Объем раствора доводят деионизированной водой до метки. Колбу помещают на ультразвуковую баню на 5 мин.

Срок хранения раствора в темной посуде при температуре (4 ± 2) °С — не более 1 мес.

6.1.6 Приготовление градуировочных растворов

6.1.6.1 Приготовление основных градуировочных растворов

6.1.6.1.1 В мерную пробирку вместимостью 10 см^3 помещают по 10 мг доксициклина, окситетрациклина гидрохлорида, тетрациклина гидрохлорида и хлортетрациклина гидрохлорида, взвешенных с точностью до 0,5 мг. Добавляют 5 см^3 метанола и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин. Объем полученного раствора доводят метанолом до метки.

6.1.6.1.2 В мерную пробирку вместимостью 10 см^3 помещают 10 мг стрептомицина сульфата, взвешенного с точностью до 0,5 мг. Добавляют 5 см^3 метанола и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин. Объем полученного раствора доводят метанолом до метки.

6.1.6.1.3 В мерную пробирку вместимостью 10 см^3 помещают 10 мг хлорамфеникола (левомицитина), взвешенного с точностью до 0,5 мг. Добавляют 5 см^3 метанола и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин. Объем полученного раствора доводят метанолом до метки.

6.1.6.1.4 В мерную пробирку вместимостью 10 см^3 помещают по 10 мг феноксиметилпенициллина, бензилпенициллина, взвешенных с точностью до 0,5 мг. Добавляют 5 см^3 метанола и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин. Объем полученного раствора доводят метанолом до метки.

6.1.6.1.5 Массовая концентрация каждого антибиотика в растворах по 6.1.6.1.1 — 6.1.6.1.4 составляет 1 мг/см^3 (или 1000 мг/дм^3).

Уточненное значение концентрации антибиотика рассчитывается с учетом содержания основного вещества.

6.1.6.1.6 Раствор антибиотика массовой концентрации 0,1 мг/см^3 (или 100 мг/дм^3) готовят из раствора антибиотика массовой концентрации 1 мг/см^3 (6.1.6.1.5) путем его разведения метанолом в 10 раз.

Растворы хранят при температуре минус (20 ± 2) °С не более 3 мес.

Перед применением раствор выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 20 мин, но не более 2 ч.

6.1.6.2 Приготовление градуировочных образцов

Для построения градуировочного графика готовят серию градуировочных образцов в количестве не менее пяти с массовыми концентрациями антибиотиков в диапазоне от 0,001 мг/дм^3 до 1 мг/дм^3 (для левомицетина в диапазоне от 0,00015 мг/дм^3 до 0,1 мг/дм^3) путем разбавления метанолом основных градуировочных растворов антибиотиков, приготовленных по 6.1.6.1.

6.1.6.3 Приготовление раствора внутреннего стандарта демеклоциклина

В мерную пробирку вместимостью 10 $см^3$ помещают 10 мг демеклоциклина, взвешенного с точностью до 0,5 мг. Добавляют 5 $см^3$ метанола и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин. Объем полученного раствора доводят метанолом до метки.

Массовая концентрация раствора внутреннего стандарта демеклоциклина в растворе составляет 1 $мг/см^3$ (уточненное значение концентрации внутреннего стандарта рассчитывается с учетом содержания основного вещества).

Путем нескольких разбавлений доводят массовую концентрацию раствора внутреннего стандарта демеклоциклина до значения 1 $мкг/см^3$. Раствор с данной концентрацией используют для внесения в исследуемые образцы.

Раствор хранят при температуре минус (20 ± 2) °С не более 3 мес.

Перед применением раствор выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 20 мин.

6.2 Подготовка хроматографической системы

6.2.1 Включают хроматограф. Подготовку хроматографа к работе осуществляют в соответствии с Руководством по эксплуатации прибора.

6.2.2 Устанавливают следующие условия хроматографирования:

– скорость потока элюента – 0,1 $см^3$/мин;

– объем вводимой пробы – 20 $мм^3$;

– температура хроматографирования – (30 ± 1) °С;

– длина волны детектирования 280 нм.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: с 0 % до 55 % мобильной фазы Б (6.1.4.2) за 25 мин.

6.2.3 Перед каждым измерением для оценки работы хроматографа проводят контрольное измерение, вводя в хроматограф образец с известным значением содержания антибиотика. В качестве такого образца может служить раствор антибиотика, приготовленный из реактива антибиотика с известным содержанием антибиотика.

6.3 Построение градуировочной характеристики

6.3.1 Для построения градуировочной зависимости анализируют серию градуировочных образцов, приготовленных по 6.1.6.2, в условиях, описанных в 6.2 и 7.

6.3.2 Используя программное обеспечение, прилагаемое к хроматографу, строят график зависимости массовой концентрации антибиотика от отношения площади хроматографического пика антибиотика к площади пика внутреннего стандарта.

Градуировочная характеристика считается приемлемой, если рассчитанное значение квадрата коэффициента корреляции для градуировочной характеристики каждого антибиотика составит не менее 0,98.

6.3.3 Градуировку проводят не реже одного раза в месяц, а также при изменении условий хроматографического анализа, при смене колонки, при замене реактивов или несоответствии результатов метрологическим требованиям.

6.4 Подготовка проб продуктов

6.4.1 Пробы молока и жидкой молочной продукции перемешивают путем перевертывания емкости с пробами не менее трех раз.

Пробы продуктов освобождают от упаковки, нагревают до температуры (20 ± 2) °С, аккуратно перемешивают и сразу же проводят измерение.

6.4.2 Пробы продуктов, содержащие ароматизаторы, пищевкусовые добавки (кофе, какао, фруктово-ягодный или овощной наполнитель и т.д.), образующие с продуктом однородную структуру, а также неотделяемые пищевкусовые компоненты (например, кокосовую стружку), полностью освобождают от упаковки (при наличии), помещают в лабораторный стакан вместимостью 500–1000 $см^3$ и нагревают на водяной бане до температуры (32 ± 2) °С, после чего полностью переносят в стакан гомогенизатора и гомогенизируют в течение 1–3 мин при частоте вращения ножей от 2000 об/мин до 5000 об/мин до получения однородной массы. Затем пробу переносят в колбу вместимостью 500 $см^3$ с притертой пробкой и охлаждают до температуры (20 ± 2) °С. Пробу для анализа отбирают сразу же после гомогенизации во избежание ее расслоения.

6.4.3 Пробы творога, творожных продуктов и творожных полуфабрикатов нагревают до темпе-

ратуры (20 ± 2) °С, растирают в фарфоровой ступке до получения однородной консистенции и переносят в колбу вместимостью 500 см^3 с притертой пробкой.

6.4.4 Пробы сухих молочных продуктов растирают в ступке, тщательно перемешивая.

6.4.5 Пробы мороженого освобождают от глазури и вафель, оставляют при комнатной температуре для отепления. Затем отделяют фрукты, орехи, изюм и другие отделяемые компоненты. При подготовке мороженого с наполнителями, обладающими текучестью (мягкая карамель, сироп, крем-брюле и т.д.), полностью растаявшее мороженое переносят в стакан гомогенизатора вместимостью от 500 см^3 до 1000 см^3 и гомогенизируют в течение 1–3 мин при частоте вращения ножей от 1000 об/мин до 5000 об/мин до получения однородной массы. Затем пробу переносят в колбу вместимостью 500 см^3 с притертой пробкой и охлаждают до температуры (20 ± 2) °С. Пробу для анализа отбирают сразу же после гомогенизации во избежание ее расслоения.

6.4.6 Пробу сыра и сырного продукта измельчают на металлической терке с мелкой перфорацией и аккуратно перемешивают в ступке.

6.4.7 Пробу масла, масляной пасты помещают в стакан вместимостью 100 см^3, расплавляют на водяной бане при температуре (60 ± 2) °С и перемешивают до получения однородной эмульсии.

6.4.8 Подготовка проб продуктов для хроматографирования

6.4.8.1 В стакан вместимостью 100 см^3 помещают (5,000 ± 0,001) г продукта, подготовленного по 6.4.2 – 6.4.6. Добавляют 20 см^3 раствора элюента мобильной фазы А (6.1.4.1) и аккуратно перемешивают. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, ополаскивая стакан раствором элюента мобильной фазы А (6.1.4.1). Объем раствора доводят раствором элюента мобильной фазы А (6.1.4.1) до метки.

Затем колбы с раствором помещают в ультразвуковую баню на 15 мин, охлаждают до температуры (20 ± 2) °С. Полученную смесь фильтруют через бумажный фильтр. В случае получения непрозрачного раствора допускается его центрифугирование при скорости вращения 15000 об/мин в течение 5 мин.

6.4.8.2 В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают (5,000 ± 0,001) г масла, пасты масляной, подготовленных по 6.4.7, и добавляют 35 см^3 раствора элюента мобильной фазы А (6.1.4.1). Колбу помещают в ультразвуковую баню на 15 мин, охлаждают до температуры (20 ± 2) °С. Объем раствора доводят раствором элюента мобильной фазы А (6.1.4.1) до метки. Полученную смесь центрифугируют при скорости вращения 15000 об/мин в течение 5 мин. Для анализа используем водную фракцию.

6.5 Подготовка проб для определения антибиотиков тетрациклиновой группы

В полипропиленовый флакон (виалу) вместимостью 15 см^3 помещают (1,000 ± 0,001) г пробы продукта, подготовленной по 6.4.1, или 10,0 см^3 пробы продукта, подготовленной по 6.4.8, добавляют 0,1 см^3 раствора внутреннего стандарта (6.1.6.3). Затем добавляют 3 см^3 ацетонитрила, закрывают крышкой и интенсивно перемешивают на встряхивателе в течение 3 мин. Оставляют на 15 мин в горизонтальном положении. Далее виалу с образцом помещают в центрифугу, предварительно охлажденную до температуры 4 °С, и центрифугируют при скорости вращения 4000 об/мин в течение 20 мин.

Полученную водную фракцию переносят в мерную пробирку вместимостью 10 см^3 и упаривают до 1 см^3 на нагревательном модуле в токе азота под вакуумом при температуре (40 ± 1) °С. К полученному остатку добавляют 3–5 см^3 буферного раствора (6.1.3), аккуратно перемешивают. Объем раствора доводят буферным раствором (6.1.3) до метки и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

6.6 Подготовка проб для определения левомицетина, стрептомицина и антибиотиков пенициллиновой группы

В полипропиленовый флакон (виалу) вместимостью 15 см^3 помещают (1,000 ± 0,001) г пробы продукта, подготовленной по 6.4.1, или 10,0 см^3 пробы продукта, подготовленной по 6.4.8. Затем добавляют 3 см^3 ацетонитрила, закрывают крышкой и интенсивно перемешивают на встряхивателе в течение 3 мин. Оставляют на 15 мин в горизонтальном положении. Далее виалу с образцом помещают в центрифугу, предварительно охлажденную до температуры 4 °С, и центрифугируют при скорости вращения 4000 об/мин в течение 20 мин.

Полученную водную фракцию переносят в мерную пробирку вместимостью 10 см^3 и упаривают до 1 см^3 на нагревательном модуле в токе азота под вакуумом при температуре (40 ± 1) °С. К полученному остатку добавляют 3–5 см^3 буферного раствора (6.1.3), аккуратно перемешивают. Объем

раствора доводят буферным раствором (6.1.3) до метки и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

6.7 Проведение твердофазной экстракции

Для проведения твердофазной экстракции картридж для ТФЭ предварительно кондиционируют 6 $см^3$ 50 %-ного раствора метанола и уравновешивают 6 $см^3$ деионизированной воды. Затем вносят пробу продукта, подготовленную по 6.5 или 6.6, и вновь промывают 6 $см^3$ деионизированной воды. Антибиотики элюируют с сорбента при помощи 6 $см^3$ раствора элюента мобильной фазы Б (6.1.4.2). Полученный элюат упаривают на нагревательном модуле досуха в токе азота под вакуумом при температуре (40 ± 1) °С, затем растворяют раствором элюента мобильной фазы Б (6.1.4.2) до 0,5 $см^3$, после чего используют для хроматографирования.

7 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:
– температура окружающего воздуха .....(20 ± 5) °С;
– относительная влажность воздуха .....(55 ± 25) %;
– атмосферное давление .....(96 ± 10) кПа;
– частота переменного тока .....(50 ± 5) Гц;
– напряжение в сети .....(220 ± 10) В.

8 Проведение измерений

8.1 Хроматографирование градуировочных растворов и анализируемой пробы продукта проводят в идентичных условиях.

8.2 Проводят два последовательных измерения. Подготовленную по 6.7 пробу вводят в колонку хроматографа и проводят хроматографический анализ в условиях, указанных в 6.2.2.

Если содержание антибиотиков в анализируемой пробе превышает значение максимального градуировочного уровня, то анализируемую пробу разводят в 10 или более раз мобильной фазой А и проводят повторные измерения.

9 Обработка результатов измерений

9.1 Обработка результатов измерений содержания антибиотиков тетрациклиновой группы, полученных с применением внутреннего стандарта

Определение содержания антибиотиков тетрациклиновой группы выполняют с помощью программного обеспечения, прилагаемого к хроматографу. С помощью программы обработки спектров вычисляют отношение площади пика определяемого антибиотика к площади пика внутреннего стандарта. Затем, используя программу обработки данных, рассчитывают содержание соответствующего антибиотика в подготовленной пробе.

9.2 Обработка результатов измерений содержания антибиотиков пенициллиновой группы, левомицетина (хлорамфеникола) и стрептомицина

Определение содержания антибиотиков выполняют с помощью программного обеспечения, прилагаемого к хроматографу. Используя градуировочный график, рассчитывают значение массовой концентрации соответствующего антибиотика в подготовленной пробе.

9.3 Массу пробы продукта, взятую для разведения, m, г, вычисляют по формуле

$$m = \frac{m_1 \cdot V_2}{V_1}, \quad (1)$$

где m_1 — масса пробы продукта, подготовленная по 6.4.2 – 6.4.7, взятая для анализа и отобранная по 6.4.9, г;

V_2 — объем пробы, подготовленный по 6.4.8 и взятый для анализа (6.5 – 6.6), $см^3$, (V_2 = 10 $см^3$);

V_1 — общий объем раствора, полученный при разведении пробы продукта согласно 6.4.8, $см^3$, (V_1 = 50 $см^3$).

9.4 Массовую долю антибиотика в продукте X, $млн^{-1}$ (мг/кг), вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \cdot V_3}{m}, \quad (2)$$

где C — массовая концентрация антибиотика, найденная по градуировочному графику, $мг/дм^3$;

V_3 — объем элюата после выпаривания по 6.7, $см^3$;

m — масса пробы продукта, подготовленная по 6.4.1 и отобранная для анализа (6.5–6.6) или определенная по формуле (1), г.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух последовательных измерений, выполненных в условиях повторяемости (ГОСТ ИСО 5725-1, пункт 3.14), если соблюдается условие приемлемости по 10.1.

9.5 Контроль точности результатов измерений

Приписанные характеристики погрешности и ее составляющих метода определения содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока при P = 0,95 приведены в таблице 1.

Таблица 1

Диапазон измерений массовой доли антибиотиков, $млн^{-1}$ (мг/кг)	Предел повторяемости $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости $R_{отн}$, %	Границы относительной погрешности, ± δ, %
От 0,0001 до 0,001 включ.	70	85	60
Св. 0,001 до 0,010 включ.	50	57	40
Св. 0,010 до 0,100 включ.	25	37	26
Св. 0,100 до 1,000 включ.	20	28	20

10 Проверка приемлемости результатов измерений

10.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов определения содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока, полученных в условиях повторяемости (два последовательных определения, n = 2), проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

Результаты измерений считаются приемлемыми при условии:

$$|X_1 - X_2| \le r_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}, \quad (3)$$

где X_1, X_2 — значения результатов двух последовательных измерений содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока, полученных в условиях повторяемости, $млн^{-1}$ (мг/кг);

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение двух последовательных измерений содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока, $млн^{-1}$ (мг/кг);

$r_{отн}$ — предел повторяемости (сходимости), значение которого приведено в таблице 1, %.

Если данное условие не выполняется, то проводят повторные измерения и проверку приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

10.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов определения содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока, полученных в условиях воспроизводимости (в двух лабораториях, m = 2), проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (подпункт 5.3.2.1).

Результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости, считаются приемлемыми при условии:

$$|X'_1 - X'_2| \le R_{отн} \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}, \quad (4)$$

где X'_1, X'_2 — значения двух результатов определения содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока, полученных в двух лабораториях в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$ (мг/кг);

$R_{отн}$ — предел воспроизводимости, значение которого приведено в таблице 1, %;

$X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов определения содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока, полученных в условиях воспроизводимости, млн$^{-1}$ (мг/кг).

Если данное условие не выполняется, то выполняют процедуры в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

11 Оформление результатов

Результат определения содержания антибиотиков в молоке и продуктах переработки молока представляют в документах, предусматривающих его использование в виде:

$$X_{ср} \pm \delta \cdot 0{,}01 \cdot X_{ср}, \text{ млн}^{-1} \text{ (мг/кг), при } P = 0{,}95, \quad (5)$$

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение результатов двух последовательных определений, млн$^{-1}$ (мг/кг);

δ — границы относительной погрешности измерений, % (таблица 1).

12 Требования безопасности

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

– помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005;

– требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;

– требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

13 Требования к оператору

Выполнение измерений может проводить специалист, имеющий специальное образование, освоивший метод и уложившийся в норматив проверки приемлемости результатов измерений при выполнении процедуры проверки приемлемости результатов измерений.

УДК 637.147.2:543.06:006.354 МКС 67.100.10

Ключевые слова: молоко, продукты переработки молока, остаточное количество антибиотиков, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Редактор *З.Ю. Белякова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *А.В. Балвановича*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 61 экз. Зак. 127.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru