МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATECOUNCILFORSTANDARDIZATION, METROLOGYANDCERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33422— 2015

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение массовой доли йодтирозинов 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—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 мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 ноября 2015 г. № 1878-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33422—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 массовой доли йодтирозинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Meat and meat products.
Determination of iodotyrosines 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, субпродукты, мясные и мясосодержащие продукты, и устанавливает метод измерения (анализа) массовой доли йодтирозинов (3-йодтирозин и 3,5-дийодтирозин) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС). Предел обнаружения йодтирозинов составляет 10 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 OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4025—95 Мясорубки бытовые. Технические условия

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 5829—71 Реактивы. Ацетил хлористый. Технические условия

ГОСТ 5848—73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6006—78 Реактивы. Бутанол-1. 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

---

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

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—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».

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 20469—95 Электромясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 23042—86 Мясо и мясные продукты. Методы определения жира

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 **йодтирозины:** Монойодтирозин (3-йодтирозин, далее — МИТ) и дийодтирозин (3,5-дийодтирозин, далее — ДИТ) — представляют собой йодсодержащие (в положении 3 — для МИТ и 3,5 — для ДИТ) производные аминокислоты тирозин, являются активной органической формой йода (I^+) в организме человека.

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

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

3.4 **аналит:** Вещество, определяемое в пробе объекта аналитического контроля.

3.5 **дериват:** Вещество, происходящее в процессе химической реакции из другого вещества и, таким образом, являющееся его производным.

4 Сущность метода

Метод основан на ферментативном гидролизе пробы, извлечении и очистке йодтирозинов из пробы методом твердофазной экстракции (ТФЭ), последующей дериватизации экстракта и ВЭЖХ-МС/МС анализе. Идентификацию аналитов осуществляют по абсолютному времени удерживания хроматографических пиков йодтирозинов, регистрируемых в режиме мониторинга множественных реакций (*MRM*). Содержание йодтирозинов определяют по площади хроматографических пиков анализируемых проб.

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

Высокоэффективный жидкостной хроматограф, укомплектованный:

- трехквадрупольным масс-спектрометрическим детектором с источником ионизации распылением в электрическом поле (*ESI*);
- градиентным 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 пределом 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.

Аппарат Сокслета.

Шкаф сушильный, способный поддерживать температуру (103 ± 2) °С.

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 15000 *g*.

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

Пипетки градуированные 1-2-1-0,5; 1-2-1-1; 1-2-1-5 по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования и относительной погрешностью дозирования не более ± 1 %.

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

Пробирки микроцентрифужные вместимостью 2,0 $см^3$.

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

Колбы круглодонные К-1-10-14/23, К-1-50-14/23 по ГОСТ 25336.

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

Чашка Петри по ГОСТ 25336.

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

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Гексан, х. ч.

Эфир петролейный.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

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

Патрон ТФЭ с обращенной фазой типа С18*.

Метанол, ос. ч.

Ацетонитрил, ос. ч.

Бутанол по ГОСТ 6006, ч. д. а.

Ацетил хлористый по ГОСТ 5829, ч. д. а.

Трис-(оксиметил)-аминометан (ТрисHCl), с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %.

3-йод-L-тирозин с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %.

3,5-дийод-L-тирозин дигидрат с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %.

Протеаза из *Streptomyces griseus*, тип XIV, >3,5 Ед/мг, порошок.

---

*Примером патрона с обращенной фазой типа С18 может быть патрон ТФЭ с обращенной фазой на основе октадецила 200 мг/3 $см^3$ типа Strata C18-E (Phenomenex № 00M-S039-B0-CB). Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования другой аппаратуры с аналогичными свойствами.

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 градуировочных растворов йодтирозинов

Для определения йодтирозинов готовят градуировочные растворы индивидуального йодтирозина (МИТ или ДИТ) с массовой концентрацией 100 $нг/см^3$ (раствор 1), 10 $нг/см^3$ (раствор 2), 1 $нг/см^3$ (раствор 3).

Взвешивают 10 мг индивидуального йодтирозина (МИТ или ДИТ), переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 20 %-ный раствор ацетонитрила до метки, помещают на 20—25 мин на ультразвуковую баню до полного растворения.

Для приготовления раствора 1 градуированной пипеткой или автоматическим дозатором отбирают 1 $см^3$ приготовленного раствора индивидуального йодтирозина (МИТ или ДИТ), переносят в круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$, упаривают на роторном испарителе при температуре не выше 60 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ смеси бутанола с хлористым ацетиленом, плотно закрывают пробкой со шлифом и ставят на водяную баню при температуре 60 °С в течение 15 мин. Упаривают растворитель досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 10 $см^3$ 20 %-ного раствора ацетонитрила.

Для приготовления раствора 2 градуированной пипеткой или автоматическим дозатором в стеклянную виалу переносят 0,1 $см^3$ раствора 1 и 0,9 $см^3$ 20 %-ного раствора ацетонитрила. Раствор тщательно перемешивают.

Для приготовления раствора 3 градуированной пипеткой или автоматическим дозатором в стеклянную виалу переносят 0,1 $см^3$ раствора 1 и 0,9 $см^3$ 20 %-ного раствора ацетонитрила. Раствор тщательно перемешивают.

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

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление 20 %-ного раствора ацетонитрила

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ добавляют 20 $см^3$ ацетонитрила и доводят до метки дистиллированной водой

8.2.2 Приготовление буферного раствора трис-(гидроксиметил)-аминометана молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ (раствор ТрисHCl)

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ помещают 12,11 г трис-(гидроксиметил)-аминометана и доводят объем до метки дистиллированной водой. По каплям добавляют соляную кислоту, доводя активную кислотность до 8,0 ед. pH, контролируя pH-метром.

8.2.3 Приготовление смеси ацетонитрила с раствором соляной кислоты молярной концентрации с(HCl) = 0,1 моль/$дм^3$ (4:1,8)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ добавляют 70—80 $см^3$ дистиллированной воды, с помощью механического дозатора приливают 0,85 $см^3$ концентрированной соляной кислоты (ρ = 1,188 $г/см^3$) и доводят объем до метки дистиллированной водой. Ацетонитрил смешивают с раствором соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/$дм^3$ в соотношении 4:1,8.

8.2.4 Приготовление смеси бутанола с хлористым ацетилом (4:1)

В 4 объема бутанола по каплям приливают один объем хлористого ацетила. Приготовление раствора проводят под вытяжной вентиляцией (в вытяжном шкафу), с охлаждением раствора проточной водой или льдом. Раствор готовят в небольших количествах перед анализом.

8.2.5 Приготовление подвижной фазы хроматографической системы

Для проведения хроматографического анализа используется двухкомпонентная подвижная фаза:

- элюент А: ацетонитрил — метанол (1:1);

- элюент В: 1 %-ный раствор муравьиной кислоты (в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 900 см^3 дистиллированной воды и добавляют 10 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают и доводят объем до метки дистиллированной водой).

Перед проведением анализа элюенты дегазируют на ультразвуковой бане.

Готовые растворы хранят в колбах с притертыми пробками, при температуре (4 ± 2) °С не более 1 мес.

8.3 Подготовка пробы

8.3.1 Предварительная подготовка пробы

Перед проведением анализа пробу предварительно высушивают на чашке Петри в сушильном шкафу при температуре (103 ± 2) °С в течение 1 ч. Затем высушенную пробу обезжиривают по ГОСТ 23042 гексаном или петролейном эфиром в экстракционном аппарате Сокслета. Пробу взвешивают до и после предварительной подготовки с записью результата взвешивания в граммах до третьего десятичного знака.

8.3.2 Ферментативный гидролиз пробы

Пробу переносят в центрифужную пробирку и растворяют в буферном растворе Трис-HCl до массовой концентрации 2 мг/см^3 (плохо растворимые пробы рекомендуется предварительно термостатировать на ультразвуковой бане с прогревом при 37 °С до полного растворения), затем добавляют ферментный препарат (протеаза из *Streptomyces griseus*) в количестве, составляющем 1/10 от массы пробы белка. Инкубируют 16 ч при 37 °С на водяной бане.

Гидролизат центрифугируют в течение 5 мин при 15000 об/мин для осаждения нерастворимых продуктов. Супернатант пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

8.3.3 Очистка гидролизата методом твердофазной экстракции (ТФЭ)

Патрон ТФЭ предварительно кондиционируют пропусканием последовательно 2 см^3 метанола и 2 см^3 дистиллированной воды. Отбирают 0,4 см^3 гидролизата пробы, приливают 0,1 см^3 ацетонитрила, смесь наносят на патрон. Экстракцию с патрона осуществляют в две стадии: последовательным элюированием 1 см^3 метанола и 1,5 см^3 смеси ацетонитрила с соляной кислотой, собирая смывы. Элюент переносят в круглодонную колбу вместимостью 50 см^3 и упаривают досуха при 60 °С.

8.3.4 Дериватизация йодтирозинов (МИТ и ДИТ)

Сухой остаток растворяют в 0,3 см^3 смеси бутанола с хлористым ацетилом и термостатируют 15 мин при 60 °С.

Растворитель упаривают досуха при 60 °С и растворяют сухой остаток в 0,4 см^3 20 %-ного раствора ацетонитрила. Перед анализом подготовленный дериват пропускают через мембранный фильтр с диаметром пор 0, 45 мкм.

Если нет возможности провести анализ в тот же день, то подготовленные к анализу пробы хранят в холодильнике при температуре от 4 °С до 6 °С не более 3 сут.

9 Проведение измерений

9.1 Хроматографические условия измерений

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

В качестве примера могут быть приведены следующие условия определения йодтирозинов (МИТ и ДИТ), выполненные на системе ВЭЖХ-МС/МС с хроматографической колонкой С18, 4,6 х 50 мм, 1,8 мкм.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление растворов элюентов по 8.2.5). 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, %		
0,0	20	80	0,6	30
2,0	90	10	0,6	30
5,0	90	10	0,6	30

9.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Для анализа подобраны следующие параметры масс-спектрометрического детектирования:

Температура источника — 100 °С;

Температура газа десольвации — 320 °С;

Скорость потока газа десольвации — 8 дм^3/мин;

Давление иглы распылителя — 2,07 Бар (30 *psi*).

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

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

Аналит	Ион предшественник, *m*/*z*	Дочерние ионы, *m*/*z*	Напряжение на фрагменторе (*Frag*), В	Энергия диссоциации (*CE*), В
3-йодтирозин (МИТ)	364,0 364,0	134,9 261,9	112 112	30 13
3,5-дийодтирозин (ДИТ)	489,9 489,9	387,8 260,9	116 116	17 30

Условия детектирования оптимизируют в ручном режиме. Для этого используют градуировочные растворы индивидуальных йодтирозинов (МИТ или ДИТ) концентрации 100, 10 и 1 нг/см^3, приготовленные 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. 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 йодтирозина (МИТ или ДИТ). С использованием средств программного обеспечения строят градуировочную зависимость площади пика определяемого йодтирозина (МИТ или ДИТ) от концентрации йодтирозина (МИТ или ДИТ) в пробе.

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. В случае необходимости готовят новые градуировочные растворы.

Хроматограмма и калибровочные кривые градуировочных растворов йодтирозинов представлены в приложении А.

Проведение градуировки обязательно при замене хроматографической колонки, а также при систематическом получении неудовлетворительных результатов контроля, выполняемого по 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 йодтирозинов (МИТ и ДИТ) 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 10 мкл подвижной фазы (А — 20 %, В — 80 %).

В виалы 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 йодтирозинов в анализируемой пробе.

Вычисление массовой доли йодтирозинов в анализируемой пробе экстракта проводят для каждого из двух параллельных определений по формуле 1.

10 Обработка результатов

В соответствие с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, создают таблицу пиков с использованием программного обеспечения. Расчеты содержания йодтирозина (МИТ или ДИТ) и площадь пика выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

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

Массовую долю йодтирозинов X, мкг/кг, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_{ст} \cdot \Sigma S_x \cdot V_р}{\Sigma S_{ст} \cdot 0{,}85 \cdot m}, \quad (1)$$

где $C_{ст}$ — массовая концентрация индивидуального йодтирозина (МИТ или ДИТ) в градуировочном растворе, нг/см^3;

ΣS_x — сумма площадей пиков двух дочерних ионов индивидуального йодтирозина (МИТ или ДИТ) в анализируемой пробе, усл. ед.;

$V_р$ — объем буфера ТрисHCl молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3, используемый для экстракции, см^3;

$\Sigma S_{ст}$ — сумма площадей пиков двух дочерних ионов индивидуального йодтирозина (МИТ или ДИТ) в градуировочном растворе, усл. ед.;

0,85 — эмпирический коэффициент, учитывающий потери йодтирозинов на стадии пробоподготовки;

m— масса анализируемой пробы, г.

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

Примечание — Массовую долю йодтирозинов 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
3-йодтирозин (МИТ)	20	$0{,}15x_{ср}$	$0{,}25X_{ср}$
3,5-дийодтирозин (ДИТ)	12	$0{,}10x_{ср}$	$0{,}15X_{ср}$
$x_{ср}$ —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:

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

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 3.

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 и калибровочные кривые градуировочных растворов йодтирозинов

А.1 Хроматограмма градуировочных растворов йодтирозинов (общий ионный ток и *MRM* переходы МИТ и ДИТ) приведена на рисунке А.1.

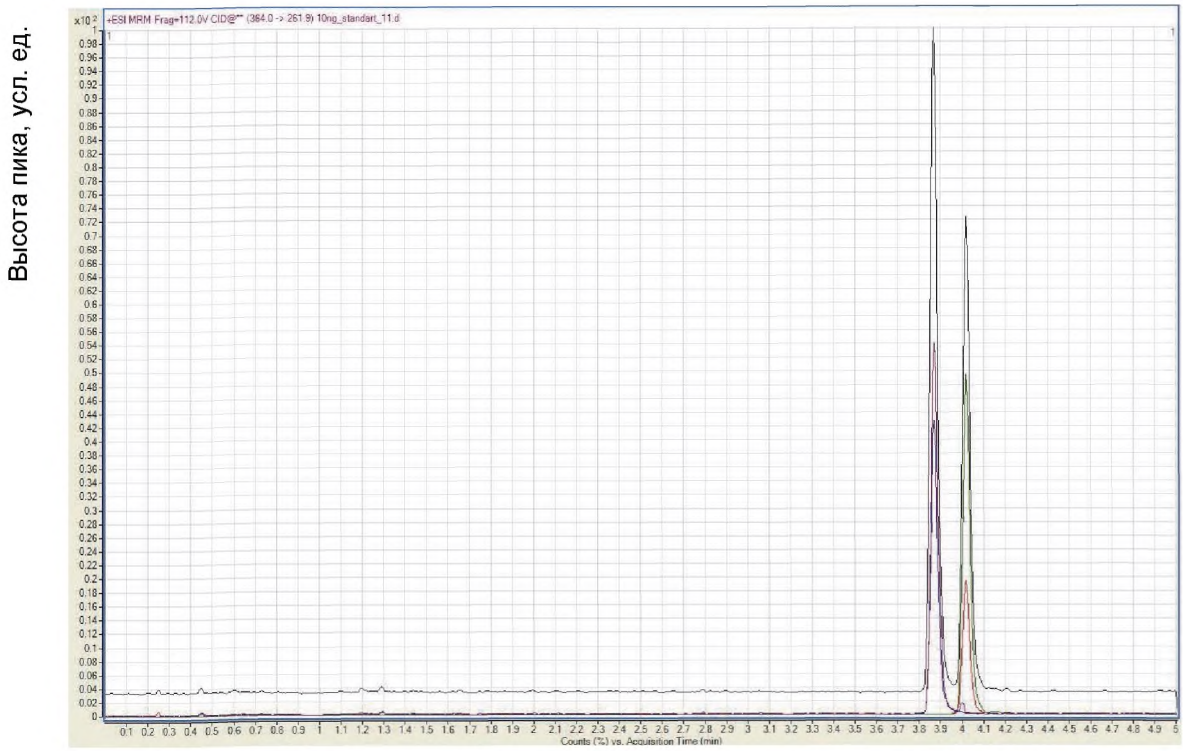

Рисунок А.1 — Хроматограмма градуировочных растворов йодтирозинов (общий ионный ток и MRM переходы МИТ и ДИТ)

А.2 Калибровочные кривые градуировочных растворов йодтирозинов в диапазоне концентраций 1,0—2000,0 нг/см^3 приведены на рисунке А.2.

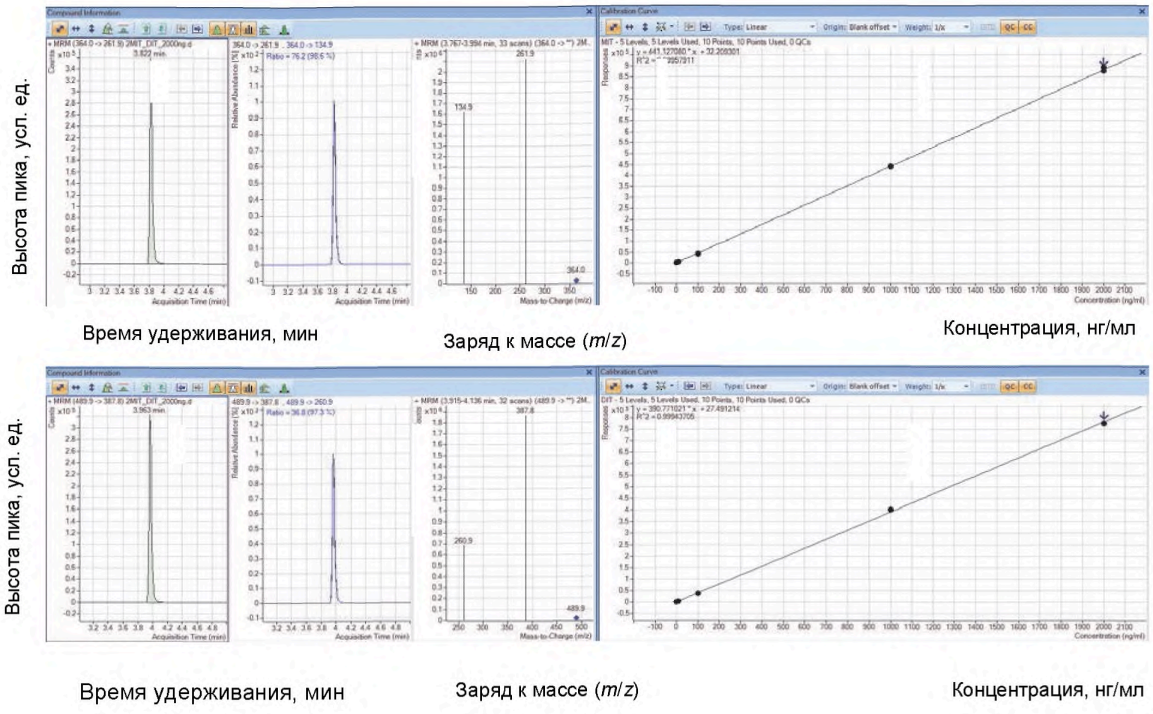

Рисунок А.2 — Калибровочные кривые градуировочных растворов йодтирозинов в диапазоне концентраций 1,0—2000,0 нг/см^3

УДК 637.5.04/.07:006.354 МКС 67.120.10

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, йодтирозины, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором

Редактор *Д.А. Мединова*

Корректор *М.С. Кабашова*

Компьютерная верстка *Д. М. Кульчицкого*

Подписано в печать 26.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 50 экз. Зак. 4308.

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