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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32798— 2014

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

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 учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45)

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
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 августа 2014 г. № 902-ст ГОСТ 32798—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 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, 2015

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Сущность метода . . . 2
4 Условия выполнения измерений и требования безопасности . . . 2
5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы . . . 3
6 Подготовка к проведению измерений . . . 4
6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов . . . 4
6.2 Приготовление растворов . . . 4
6.3 Приготовление градуировочных растворов . . . 5
6.4 Построение градуировочной характеристики . . . 6
6.5 Условия хроматографических измерений . . . 8
7 Отбор и подготовка проб . . . 8
7.1 Отбор проб . . . 8
7.2 Подготовка проб . . . 8
8 Порядок выполнения измерений . . . 9
8.1 ВЭЖХ-МС/МС анализ . . . 9
8.2 Контроль качества измерений . . . 9
9 Обработка результатов ВЭЖХ-МС/МС анализа . . . 9
10 Метрологические характеристики . . . 10
11 Оформление результатов измерений . . . 10
12 Контроль неопределенности результатов измерений . . . 11
Приложение А (обязательное) Контроль стабильности результатов измерений . . . 11

МКС 67.050, 67.100, 67.120, 67.180

Поправка к ГОСТ 32798—2014 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 4.1	- температура окружающего воздуха . . . от 20 °С до 30 °С;	- температура окружающего воздуха . . . от 15 °С до 30 °С;
	- напряжение в питающей сети . . . от 200 до 240 В;	—
	- частота переменного тока . . . от 49 до 51 Гц;	—
	- относительная влажность воздуха . . . от 40 % до 80 %.	- относительная влажность воздуха . . . от 20 % до 80 %.

(ИУС № 7 2017 г.)

Поправка к ГОСТ 32798—2014 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Раздел 2	—	ГОСТ 29245—91 Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей
Пункт 7.2.4. Последний абзац	—	Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245 (пункт 3.4).

(ИУС № 10 2018 г.)

МКС 67.050
67.100
67.120
67.180

Поправка к ГОСТ 32798—2014 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

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

(ИУС № 7 2019 г.)

МКС 67.050, 67.100, 67.120, 67.180

Поправка к ГОСТ 32798—2014 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 5.1, шестое перечисление	или весы лабораторные по ГОСТ 24104, высокого или специального класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г и ценой поверочного деления 0,1 мг;	и весы лабораторные по ГОСТ 24104, I класса точности, с наибольшим пределом взвешивания не более 220 г и ценой поверочного деления 0,1 мг;
седьмое перечисление	- весы микроаналитические, с наибольшим пределом взвешивания 52 г, с пределом абсолютной допускаемой погрешности не более ± 0,001 мг;	—

(ИУС № 12 2019 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Food products, food raw materials. Method for determination of the aminoglycosides content by high performance liquid chromatography with mass spectrometry detector

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты в части молока, молочных продуктов, мяса и мясных продуктов, мяса и продуктов из мяса птицы, яиц, яичного порошка, яичного меланжа, меда, рыбы, а также продовольственное сырье и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (далее — ВЭЖХ-МС/МС) для определения остаточного содержания аминогликозидов.

Диапазон измерений для гентамицина — от 20 до 80 мкг/кг, для канамицина — от 40 до 160 мкг/кг, для амикацина, гигромицина и спектиномицина — от 100 до 400 мкг/кг, для дигидрострептомицина, стрептомицина — от 100 до 800 мкг/кг, для неомицина, паромомицина — от 200 до 800 мкг/кг, для апрамицина — от 400 до 1600 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.2.085—2002 Сосуды, работающие под давлением. Клапаны предохранительные. Требования безопасности

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

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

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3760—79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

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

ГОСТ 5848—73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

Издание официальное

ГОСТ 13867—68 Продукты химические. Обозначения чистоты

ГОСТ 19792—2001 Мед натуральный. Технические условия

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

ГОСТ 24104—2001* Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

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

ГОСТ 31339—2006 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 31467—2012 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Количественное определение остаточного содержания аминогликозидов проводят по площадям хроматографических пиков идентифицированных соединений с помощью градуировочной характеристики, полученной при анализе градуировочных растворов известных соединений в аналогичных условиях.

4 Условия выполнения измерений и требования безопасности

4.1 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . от 20 °С до 30 °С;
- атмосферное давление . . . . . от 84 до 106 кПа;
- напряжение в питающей сети . . . . . от 200 до 240 В;
- частота переменного тока . . . . . от 49 до 51 Гц;
- относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 80 %.

4.2 Хроматографические измерения проводят в условиях, указанных в инструкции по эксплуатации соответствующего прибора.

4.3 Применяемые в работе реактивы относятся к веществам 1-го и 2-го классов опасности по ГОСТ 12.1.007, при работе с ними необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

4.4 Помещения, в которых проводится анализ и подготовка проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

4.5 Приготовление градуировочных растворов проводят под тягой в вытяжном шкафу.

4.6 При проведении испытаний соблюдают требования ГОСТ 12.2.085.

4.7 При выполнении измерений на хромато-масс-спектрометре следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019, пожаровзрывобезопасности по ГОСТ 12.1.018 и инструкции по эксплуатации прибора.

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

---

* На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

5.1 Для определения остаточного содержания аминогликозидов применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование и материалы:

- масс-спектрометр с диапазоном измерений от 150 до 650 атомных единиц массы (а. е. м.), массовым разрешением не менее 650, с пределом среднеквадратического отклонения случайной составляющей измерения массового числа не более 0,03 а. е. м., с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС);
- колонку хроматографическую обращенно-фазную длиной не менее 100 мм с диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм;
- систему высокоэффективную жидкостную хроматографическую, состоящую из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до (45,0 ± 0,8) °С;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;
- часы электронно-механические по ГОСТ 27752;
- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 г или весы лабораторные по ГОСТ 24104, высокого или специального класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г и ценой поверочного деления 0,1 мг;
- весы микроаналитические, с наибольшим пределом взвешивания 52 г, с пределом абсолютной допускаемой погрешности не более ±0,001 мг;
- модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и максимальной температурой термостатирования 40 °С;
- измельчитель-гомогенизатор погружной лабораторный со скоростью измельчающей насадки от 200 до 5000 об/мин;
- встряхиватель (шейкер) вибрационный для пробирок орбитального типа движения с амплитудой встряхивания 3 мм и диапазоном скоростей от 150 до 2000 об/мин;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 15000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 $см^3$ и микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 $см^3$;
- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 $дм^3$;
- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;
- картриджи для твердофазной экстракции объемом не менее 10 $см^3$, заполненные катионообменным сорбентом на основе силикагеля с привитыми карбоксикислотными группами, с диаметром частиц от 47 до 60 мкм;
- систему для упаривания растворителей из пробирок;
- pH-метр или универсальный иономер диапазоном измерения от 4 до 9 ед. pH с погрешностью измерения ±0,05 ед. pH;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 2,5—10,0 $мм^3$, 5—25 $мм^3$, 20—100 $мм^3$, 200—1000 $мм^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более 1 %;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 $см^3$ с завинчивающимися крышками;
- пробирки полипропиленовые микроцентрифужные вместимостью 1,5 $см^3$ с крышками;
- пробирки П-2-10-14/23ХС по ГОСТ 1770;
- пипетки стеклянные градуированные по ГОСТ 29227;
- колбы конические Кн-1-250-14/23 ТС по ГОСТ 25336;
- колбы 1-10(50, 100, 500)-2 по ГОСТ 1770;
- цилиндры 1-50(100)-1 по ГОСТ 1770;
- шкаф сушильный лабораторный с рабочим диапазоном температур от 50 °С до 200 °С;
- систему получения деионизированной воды высокой чистоты;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 5 °С;
- камеру лабораторную морозильную с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 30 °С до минус 40 °С.

5.2 Для определения остаточного содержания аминогликозидов используют следующие реактивы:

- этилацетат по ГОСТ 22300, х. ч.;

- ацетон по ГОСТ 2603;
- аммиак водный по ГОСТ 3760, х. ч.;
- гептафторбутановую (гептафтормасляную) кислоту с содержанием основного вещества не менее 98 %;
- аммоний муравьинокислый (формиат), х. ч.;
- кислоту муравьиную по ГОСТ 5848, х. ч.;
- кислоту трихлоруксусную, х. ч.;
- соль динатриевую этилендиамин-N, N, N′, N′-тетрауксусной кислоты 2-водную, с содержанием основного вещества не менее 98 %;
- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709;
- метанол, х. ч.;
- н-гексан, х. ч.;
- ацетонитрил, х. ч.

Все реактивы должны относиться к подгруппе чистоты 2 (х. ч.) или 3 (ч. д. а.) по ГОСТ 13867.

5.3 При определении остаточного содержания аминогликозидов применяют следующие вещества для градуировки с содержанием безводного свободного основания:
- амикацин дисульфат — не менее 87 %;
- апрамицин сульфат — не менее 94 %;
- гентамицин сульфат — не менее 87 %;
- гигромицин Б — не менее 67 %;
- дигидрострептомицин сульфат — не менее 95 %;
- канамицин А дисульфат — не менее 91 %;
- неомицин трисульфат — не менее 91 %;
- паромомицин сульфат — не менее 72 %;
- спектиномицин дигидрохлорид — не менее 91 %;
- стрептомицин сульфат — не менее 93 %.

5.4 Допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов по качеству не ниже указанных.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов

6.1.1 Мойку и сушку посуды проводят в помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией.

6.1.2 Стеклянную посуду подвергают стандартной процедуре очистки лабораторной посуды с последующей последовательной промывкой органическими растворителями: этилацетатом (однократно), ацетоном (дважды).

6.1.3 Процедуру промывки органическими растворителями следует проводить в вытяжном шкафу. Рекомендуется на стадиях промывки использовать ультразвуковую баню. Окончательную сушку посуды проводят в сушильном шкафу, установленном в вытяжном шкафу, при температуре от 105 °С до 110 °С.

6.1.4 Каждую новую партию реактивов проверяют на отсутствие контаминации анализируемыми соединениями путем проведения холостого опыта в соответствии с процедурой анализа.

6.2 Приготовление растворов

6.2.1 Приготовление подвижных фаз А и Б

6.2.1.1 Для приготовления подвижной фазы А в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ приливают 350—400 $см^3$ деионизованной воды, добавляют 1,25 $см^3$ гептафторбутановой кислоты, перемешивают и доводят до метки деионизированной водой. Раствор дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5 мин.

6.2.1.2 Для приготовления подвижной фазы Б в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ приливают 350—400 $см^3$ ацетонитрила, добавляют 1,25 $см^3$ гептафторбутановой кислоты, перемешивают и доводят до метки ацетонитрилом. Раствор дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5 мин.

6.2.1.3 Срок годности растворов при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.2.2 Приготовление 3 %-ного раствора аммиака

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 4 см^3 концентрированного водного раствора аммиака, доводят до метки деионизированной водой и перемешивают.

Срок годности раствора при температуре от 2 °С до 4 °С — не более 1 мес.

6.2.3 Приготовление формиатного буферного раствора молярной концентрации 0,05 моль/дм^3 и pH 7,3

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 0,158 г формиата аммония, приливают 35—40 см^3 деионизованной воды, перемешивают, измеряют pH и устанавливают его значение до (7,3 ± 0,1) 3 %-ным раствором аммиака. Доводят до метки деионизированной водой и перемешивают.

Срок годности раствора при температуре от 2 °С до 4 °С — не более 1 мес.

6.2.4 Приготовление раствора этилендиаминтетраацетата натрия концентрацией 0,4 ммоль/дм^3 для экстракции

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 90 см^3 деионизированной воды, 14,9 мг дигидрата этилендиаминтетраацетата натрия, 4 г трихлоруксусной кислоты, перемешивают и дегазируют раствор на ультразвуковой бане в течение 5 мин. Доводят объем раствора до метки деионизированной водой и перемешивают.

Срок годности раствора при температуре от 2 °С до 4 °С — не более 1 мес.

6.2.5 Приготовление раствора муравьиной кислоты в метаноле в объемном соотношении (10:90)

В коническую колбу вместимостью 250 см^3 вносят 135 см^3 метанола и 15 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

6.2.6 Приготовление раствора для перерастворения

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 45 см^3 деионизированной воды, 6 см^3 ацетонитрила, 125 мм^3 гептафторбутановой кислоты и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

6.3 Приготовление градуировочных растворов

6.3.1 Приготовление исходных растворов аминогликозидов C_0

Для приготовления исходных растворов веществ для градуировки C_0 с концентрацией 500 мкг/см^3 для каждого аминогликозида рассчитывают необходимую массу анализируемой пробы *i*-го вещества, мг, с учетом содержания свободного основания по формуле

$$m_i = \frac{C_0 V}{P_i} \cdot 100, \quad (1)$$

где C_0 — концентрация исходного раствора, мг/см^3;

V — объем мерной колбы, см^3;

P_i — содержание свободного основания *i*-го вещества, %.

На лабораторных весах измеряют массу мерной колбы вместимостью 10 см^3. В колбу вносят анализируемую пробу вещества для градуировки, несколько превышающую расчетную, и снова взвешивают. По разности масс находят массу внесенного вещества (она должна совпадать с расчетной или несколько превышать ее). Добавляют 8 см^3 деионизированной воды, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 5 мин. Доводят объем до метки этим же растворителем и снова перемешивают.

Для получения требуемой концентрации исходных растворов добавляют пипеткой в каждую колбу дополнительный объем деионизированной воды для *i*-го вещества, см^3, рассчитанный по формуле

$$V = \frac{(m_{ci} - m_i)P_i}{C_0 \cdot 100}, \quad (2)$$

где m_{ci} — масса анализируемой пробы *i*-го вещества, мг;

m_i — расчетная масса анализируемой пробы *i*-го вещества, мг;

P_i — содержание свободного основания *i*-го вещества, %;

C_0 — концентрация исходного раствора, мг/см^3.

Срок годности растворов при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С — не более 1 мес.

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

6.3.2 Приготовление рабочего раствора C_1

Для приготовления рабочего раствора C_1 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 переносят следующие объемы каждого раствора C_0: гентамицина — 80 мм^3, канамицина — 160 мм^3, амикацина, гигромицина и спектиномицина — 400 мм^3, дигидрострептомицина, неомицина, стрептомицина и паромомицина — 800 мм^3, апрамицина — 1600 мм^3, доводят объем до метки деионизированной водой и тщательно перемешивают.

Массовая концентрация в растворе C_1 составляет: для гентамицина — 4 мкг/см^3, канамицина — 8 мкг/см^3, амикацина, гигромицина и спектиномицина — 20 мкг/см^3, дигидрострептомицина, неомицина, стрептомицина и паромомицина — 40 мкг/см^3, апрамицина — 80 мкг/см^3.

Срок годности раствора при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С — не более 1 мес.

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

6.3.3 Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_5 аминогликозидов

6.3.3.1 Приготовление матричного градуировочного раствора G_1

Для приготовления раствора G_1 в полипропиленовую пробирку приливают 0,005 см^3 раствора C_1 к остатку после концентрирования чистой пробы, полученной и проанализированной ранее, в соответствии с требованиями раздела 7, доводят объем до 1 см^3 с помощью раствора для перерастворения (6.2.6), дегазируют на ультразвуковой бане в течение 15 мин и перемешивают в шейкере в течение 5 мин. Переливают экстракт в микроцентрифужную полипропиленовую пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 5 мин при температуре 4 °С.

Массовая концентрация каждого аминогликозида в растворе G_1 составляет: для гентамицина — 10 мкг/кг, канамицина — 20 мкг/кг, амикацина, гигромицина и спектиномицина — 50 мкг/кг, дигидрострептомицина, неомицина, стрептомицина и паромомицина — 100 мкг/кг, апрамицина — 200 мкг/кг.

6.3.3.2 Приготовление матричных градуировочных растворов G_2—G_5

Растворы G_2 — G_5 готовят как раствор G_1, при этом для приготовления раствора:

- G_2 приливают 0,01 см^3 раствора C_1;
- G_3 приливают 0,02 см^3 раствора C_1;
- G_4 приливают 0,03 см^3 раствора C_1;
- G_5 приливают 0,04 см^3 раствора C_1.

Массовая концентрация каждого аминогликозида в растворе G_2 составляет: для гентамицина — 20 мкг/кг, канамицина — 40 мкг/кг, амикацина, гигромицина и спектиномицина — 100 мкг/кг, дигидрострептомицина, неомицина, стрептомицина и паромомицина — 200 мкг/кг, апрамицина — 400 мкг/кг.

Массовая концентрация каждого аминогликозида в растворе G_3 составляет: для гентамицина — 40 мкг/кг, канамицина — 80 мкг/кг, амикацина, гигромицина и спектиномицина — 200 мкг/кг, дигидрострептомицина, неомицина, стрептомицина и паромомицина — 400 мкг/кг, апрамицина — 800 мкг/кг.

Массовая концентрация каждого аминогликозида в растворе G_4 составляет: для гентамицина — 60 мкг/кг, канамицина — 120 мкг/кг, амикацина, гигромицина и спектиномицина — 300 мкг/кг, дигидрострептомицина, неомицина, стрептомицина и паромомицина — 600 мкг/кг, апрамицина — 1200 мкг/кг.

Массовая концентрация каждого аминогликозида в растворе G_5 составляет: для гентамицина — 80 мкг/кг, канамицина — 160 мкг/кг, амикацина, гигромицина и спектиномицина — 400 мкг/кг, дигидрострептомицина, неомицина, стрептомицина и паромомицина — 800 мкг/кг, апрамицина — 1600 мкг/кг.

Срок годности растворов в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С — не более суток.

6.4 Построение градуировочной характеристики

6.4.1 Для получения градуировочных данных используют не менее трех уровней концентраций матричных градуировочных растворов. Определяемое в анализируемом образце содержание аминогликозидов должно находиться в диапазоне концентраций градуировочной характеристики.

6.4.2 При установлении градуировочной характеристики в инжектор хроматографа вводят по 5 мм^3 и не менее двух раз матричные градуировочные растворы G_1—G_5 (6.3.3) различных уровней концентраций в условиях, указанных в 6.5.

6.4.3 Вычисление площади пика проводят по выбранному дочернему иону анализируемого соединения

Для подтверждения идентичности каждого обнаруженного аминогликозида рассчитывают отношение площадей пиков двух дочерних ионов для каждого соединения в градуировочном растворе.

6.4.4 Время удерживания определяемых веществ устанавливают при анализе градуировочных растворов. Значения абсолютного времени удерживания анализируемых соединений в предложенных хроматографических условиях приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Время удерживания аминогликозидов и отношения массы к заряду (*m*/z) для их ионов

Аминогликозид	Время удерживания, мин	Ион-предшественник, *m*/*z*	Дочерние ионы, *m*/*z**
Амикацин	7,8	586,3	264,2/425,2
Апрамицин	10,7	540,3	378,2/217,1
Гентамицин	12,4	478,3	322,2/157,1
Гигромицин Б	6,2	528,3	177,1/352,1
Дигидрострептомицин	6,7	584,3	263,1/392,2
Канамицин А	8,2	485,3	324,2/163,1
Неомицин	12,8	615,4	203,1/293,1
Паромомицин	10,5	616,3	293,1/324,2
Спектиномицин	5,1	351,2	207,2/158,1
Стрептомицин	6,5	582,3	263,2/390,2
* Первый из указанных ионов используют для количественного определения, второй — для идентификации.			

Относительное отклонение времени удерживания каждого аминогликозида в анализируемых пробах от градуировочных данных не должно превышать 2,5 %.

6.4.5 Для проверки приемлемости результатов измерений рассчитывают значение относительной повторяемости r_i,%, параллельных определений для каждого градуировочного образца — разности между результатами параллельных определений, отнесенные к их среднему значению по формуле

$$r_i = \frac{|X_{i1} - X_{i2}|}{\overline{X}_i} \cdot 100, \quad (3)$$

где X_{i1} и X_{i2} — параллельные определения при получении *i*-го результата количественного химического анализа;

$\overline{X}_i$ — среднеарифметическое значение X_{i1} и X_{i2} (*i*-й результат анализа).

Значения r_i (i = 1, 2, ..) не должны превышать пределов повторяемости $r_{отн}$, установленных при P = 0,95 и приведенных в таблице 2.

Таблица 2 — Пределы относительной повторяемости $r_{отн}$

Аминогликозид	Диапазон измерений содержания аминогликозидов, мкг/кг	Предел повторяемости $r_{отн}$, %, при P = 0,95, i = 2
Амикацин	От 100 до 400 включ.	50
Апрамицин	» 400 » 1600 »	69
Гентамицин	» 20 » 80 »	55
Гигромицин Б	» 100 » 400 »	83
Дигидрострептомицин	» 100 » 800 »	58
Канамицин А	» 40 » 160 »	83
Неомицин	» 200 » 800 »	72
Паромомицин	» 200 » 800 »	61
Спектиномицин	» 100 » 400 »	72
Стрептомицин	» 100 » 800 »	80

6.4.6 Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят после анализа каждых 20 исследуемых образцов однократным измерением градуировочных растворов G_3 и G_4. Градуировочная характеристика считается стабильной, если рассчитанные значения концентраций определяемых веществ находятся в диапазоне 75 %—125 %. В противном случае проводят повторный анализ градуировочных растворов, построение градуировочной характеристики и анализ испытуемых проб.

6.5 Условия хроматографических измерений

6.5.1 Жидкостный хроматограф и хромато-масс-спектрометр включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры, рекомендуемые изготовителем колонок. Например, для колонки диаметром 2 мм, длиной 100 мм, с обращенно-фазным сорбентом С18 с размером частиц 3,5 мкм, применяют следующие хроматографические условия:

- температура колонки — 45 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,20 см^3/мин;
- объем вводимой пробы — 20 мм^3.

6.5.2 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (подвижные фазы готовят в соответствии с 6.2.1): в начальный момент и до 1,00 мин колонку промывают смесью, содержащей 90 % подвижной фазы А и 10 % подвижной фазы Б; с 1,00 по 6,00 мин содержание подвижной фазы Б в смеси линейно увеличивают от 10 % до 25 %; с 6,00 до 8,50 мин состав смеси растворителей не изменяют; с 8,50 по 11,00 мин содержание подвижной фазы Б в смеси линейно увеличивают от 25 % до 31 %; с 11,01 по 14,00 мин содержание подвижной фазы Б в смеси линейно увеличивают от 31 % до 35 %; с 14,01 по 17,00 мин колонку промывают смесью, содержащей 10 % подвижной фазы А и 90 % подвижной фазы Б; с 17,01 по 25,00 мин колонку уравновешивают для следующего анализа раствором для перерастворения (см. 6.2.6).

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб мяса и мясных продуктов — по ГОСТ 7269.

7.1.2 Отбор проб мяса птицы, пищевых субпродуктов и полуфабрикатов из мяса птицы — по ГОСТ 31467.

7.1.3 Отбор проб молока и молочных продуктов — по ГОСТ 26809.

7.1.4 Отбор проб яиц, яичного меланжа и яичного порошка проводят по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

7.1.5 Отбор проб рыбы — по ГОСТ 31339.

7.1.6 Отбор проб меда — по ГОСТ 19792.

7.2 Подготовка проб

7.2.1 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, мяса и субпродуктов птицы, рыбы

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. Взвешивают 2,00 г пробы в полипропиленовой пробирке, приливают 4 см^3 буферного раствора (см. 6.2.3), 6 см^3 раствора для экстракции (см. 6.2.4), измельчают на гомогенизаторе и помещают на 10 мин в шейкер. Затем центрифугируют при 4100 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. Переливают надосадочную жидкость в новую полипропиленовую пробирку. К осадку приливают 4 см^3 раствора для экстракции (см. 6.2.4) и помещают на 10 мин в шейкер, после чего центрифугируют при 4100 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. Надосадочные жидкости, полученные при первой и второй экстракции, объединяют, измеряют pH и устанавливают его значение до (8,0 ± 0,1) водным аммиаком. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С.

Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ) на картридже. Перед нанесением экстракта на картридж последовательно кондиционируют сорбент 3 см^3 метанола и дважды 3 см^3 буферного раствора (см. 6.2.3). Пропускают через картридж полученный экстракт. Затем промывают картридж 3 см^3 буферного раствора (см. 6.2.3), сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 15 мин и промывают 3 см^3 раствора метанола (см. 6.2.5), собирая элюат в пробирку. Пробирку помещают в термостатируемый нагревательный модуль с системой отдувки растворителей и упаривают досуха в токе азота при температуре 40 °С.

К полученному остатку приливают 1 см^3 раствора для перерастворения (6.2.6), дегазируют на ультразвуковой бане в течение 15 мин и перемешивают в шейкере в течение 5 мин. Переливают экстракт в микроцентрифужную полипропиленовую пробирку и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 5 мин при температуре 4 °С. Полученный раствор используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

7.2.2 Подготовка проб яичного порошка

Отобранную пробу яичного порошка перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают 2,0 г в полипропиленовой пробирке, приливают 4 см^3 буферного раствора (см. 6.2.3), 6 см^3 раствора для экстракции (см. 6.2.4) и помещают на 10 мин в шейкер.

Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 7.2.1.

7.2.3 Обработка проб яиц и меланжа

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе, меланж тщательно перемешивают. Взвешивают 2,0 г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке, приливают 4 см^3 буферного раствора (см. 6.2.3), 6 см^3 раствора для экстракции (см. 6.2.4) и помещают на 10 мин в шейкер.

Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 7.2.1.

7.2.4 Подготовка проб молока и молочных продуктов

Отобранную пробу перед анализом тщательно перемешивают.

Взвешивают 2,0 г пробы в полипропиленовой пробирке, приливают 4 см^3 буферного раствора (см. 6.2.3), 6 см^3 раствора для экстракции (см. 6.2.4) и помещают на 10 мин в шейкер.

Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 7.2.1.

7.2.5 Подготовка проб меда

Отобранную пробу перед анализом тщательно перемешивают.

Взвешивают 2,0 г пробы в полипропиленовой пробирке, приливают 4 см^3 буферного раствора (см. 6.2.3), 6 см^3 раствора для экстракции (см. 6.2.4) и помещают на 3 мин в шейкер.

Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 7.2.1.

8 Порядок выполнения измерений

8.1 ВЭЖХ-МС/МС анализ

8.1.1 Для определения остаточного содержания аминогликозидов проводят ВЭЖХ-МС/МС анализ в условиях, указанных в 6.5.

8.1.2 ВЭЖХ-МС/МС анализ должен выполняться в виде серии измерений, включающей следующие образцы:

- образцы подвижных фаз А и Б;
- образец, не содержащий аминогликозидов, приготовленный и проанализированный ранее, в соответствии с требованиями раздела 7, в зависимости от типа исследуемой матрицы;
- два контрольных образца с известным содержанием аминогликозидов;
- градуировочные растворы;
- анализируемые пробы.

Результаты измерений округляют до целого значения и выражают в микрограммах на килограмм.

8.1.3 Время удерживания аминогликозидов определяют при анализе градуировочных растворов.

8.2 Контроль качества измерений

8.2.1 Каждая серия измерений включает в себя несколько степеней подтверждения качества измерений.

8.2.2 20 мм^3 градуировочного раствора G_1 (6.3.3.1) вводят в инжектор хроматографа. Полученное соотношение сигнал/шум для каждого аналита должно быть не менее 10.

8.2.3 При анализе каждой партии проб проводят обработку «чистой пробы» в соответствии с 7.2 в зависимости от типа исследуемой матрицы. Наличие пиков, значение времени удерживания которых совпадает со значением времени удерживания пиков определяемых компонентов, указывает на наличие контаминации анализируемых проб при их подготовке.

8.2.4 Для исключения возможной контаминации реагентов, используемых в процессе подготовки проб, анализируемую пробу заменяют 2,0 см^3 деионизованной воды.

9 Обработка результатов ВЭЖХ-МС/МС анализа

9.1 В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, проводят количественную обработку хроматограмм с использованием программного обеспечения.

9.2 Построение линейного градуировочного графика и расчет концентрации аминогликозидов в исследуемых образцах выполняется системой обработки данных в автоматическом режиме.

9.3 Вычисление площади пика проводят на двух дочерних ионах (согласно таблице 1) для каждого аминогликозида. Отклонения относительных ионных интенсивностей ионов в анализируемой пробе от относительных ионных интенсивностей ионов, полученных при анализе градуировочных растворов, не должны превышать значений, указанных в таблице 3.

Таблица 3 — Допустимые отклонения относительных ионных интенсивностей

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

9.4 За окончательный результат измерений содержания аминогликозидов принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, округленное до целого числа и выраженное в микрограммах на килограмм (мкг/кг).

10 Метрологические характеристики

Метод, установленный в настоящем стандарте, обеспечивает выполнение измерений содержания аминогликозидов с расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата $k = 2$, указанной в таблице 4.

Таблица 4 — Значения относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата $k = 2$ в диапазонах измерений массовой доли аминогликозидов, мкг/кг

Аминогликозид	Диапазон измерений содержания аминогликозидов, мкг/кг	Значения относительной расширенной неопределенности U_i, %, при коэффициенте охвата $k = 2$
Амикацин	От 100 до 400 включ.	54
Апрамицин	» 400 » 1600 »	74
Гентамицин	» 20 » 80 »	60
Гигромицин Б	» 100 » 400 »	94
Дигидрострептомицин	» 100 » 800 »	62
Канамицин А	» 40 » 160 »	90
Неомицин	» 200 » 800 »	78
Паромомицин	» 200 » 800 »	70
Спектиномицин	» 100 » 400 »	78
Стрептомицин	» 100 » 800 »	86
Примечание — Значения относительной расширенной неопределенности, указанные в таблице 4, соответствуют границам относительной погрешности результатов измерений при $P = 0,95$.		

11 Оформление результатов измерений

Содержание i-го аминогликозида M, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$M = \overline{X}_i \pm 0,01 \cdot U_i \cdot \overline{X}_i, \quad (4)$$

где $\overline{X}_i$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений массовой доли i-го аналита в анализируемой пробе, мкг/кг,

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания i-го аналита аминогликозида для соответствующего диапазона измерений, % (см. таблицу 4).

12 Контроль неопределенности результатов измерений

При соблюдении требований настоящего стандарта рекомендуется в ходе анализа каждой серии проб проводить их анализ для контроля с установленным значением содержания *i*-го аминогликозида с использованием стандартной процедуры подготовки проб (см. 7.2).

Результаты измерений признают удовлетворительными при выполнении следующего неравенства

$$|\overline{X}_i - X| \le \overline{X}_i U_i \cdot 0{,}01, \quad (5)$$

где $\overline{X}_i$ — среднеарифметическое значение результатов параллельных определений массовой доли *i*-го аминогликозида в образце для контроля, мкг/кг;

X — установленное значение содержания *i*-го аминогликозида в образце для контроля, мкг/кг;

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания *i*-го аминогликозида для соответствующего диапазона измерений (см. таблицу 4), %.

Приложение А
(обязательное)

Контроль стабильности результатов измерений

А.1 Периодичность контроля стабильности результатов измерений регламентируют в руководстве по качеству лаборатории.

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности рутинного анализа с изменяющимися факторами «время» и «оператор».

Применяя метод контрольных карт Шухарта, проверяют стабильность этих результатов измерений и оценивают стандартное отклонение промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами «время» и «оператор». После отбора испытуемую пробу от каждой партии подготавливают в лаборатории для анализа. Одну пробу, подвергавшуюся анализу во время смены (C_1), анализирует повторно другой оператор в другую смену (C_2), и результаты сравнивают. Значение стандартного отклонения промежуточной прецизионности ($\sigma_{I(T,O)}$) устанавливают в лаборатории по результатам измерений за предыдущий период. Параметры контрольной карты пределов для каждого диапазона рассчитывают следующим образом:

- среднюю линию по формуле

$$d_2 \cdot \sigma_{I(T,O)} = 1{,}128 \cdot \sigma_{I(T,O)}, \quad (A.1)$$

где $\sigma_{I(T,O)}$ — среднеквадратическое отклонение промежуточной прецизионности, %;

- верхний предел действия по формуле

$$UCL_д = 3{,}686 \cdot \sigma_{I(T,O)}; \quad (A.2)$$

- верхний предел предупреждения по формуле

$$UCL_п = 2{,}834 \cdot \sigma_{I(T,O)}. \quad (A.3)$$

Расхождение w рассчитывают по формуле

$$w = \frac{2 \cdot |C_1 - C_2| \cdot 100}{(C_1 + C_2)}. \quad (A.4)$$

Расхождение w наносят на карту в течение контролируемого периода.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30. После этого проводят оценку стандартного отклонения промежуточной прецизионности ($S_{I(T,O)}$) результатов по формуле

$$S_{I(T,O)} = \frac{\sum_{i=1}^{k} w_i}{m_k \cdot d_2}, \quad (A.5)$$

где m_k — число измерений.

Полученное значение $S_{I(T,O)}$ используют для последующего контроля стабильности результатов измерений.

УДК 637,638:614.3:006.354

МКС 67.050
67.100
67.120
67.180

Ключевые слова: продукты пищевые, продовольственное сырье, аминогликозиды, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.М. Малахова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 24.03.2015. Подписано в печать 30.04.2015. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,45. Тираж 40 экз. Зак. 1820.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru