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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
ISO/TS 15495/
IDF/RM 230—
2012**

МОЛОКО, МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИТАНИЕ ДЛЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Руководящие указания для количественного определения меламина и циануровой кислоты методом жидкостной хроматографии– тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS)

(ISO/TS 15495/IDF/RM 230, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

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 ПОДГОТОВЛЕН Секретариатом ТК 470/МТК 532 «Молоко и продукты переработки молока» и ООО НТК «Молочная Индустрия»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 15 ноября 2012 г. № 42-2012)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному документу ISO/TS 15495/IDF/RM 230 Milk, milk products and infant formulae — Guidelines for the quantitative determination of melamine and cyanuric acid by LC-MS/MS [Молоко, молочные продукты и питание для детей раннего возраста. Руководящие указания для количественного определения меламина и циануровой кислоты методом жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (LC-MS|MS)].

Международный документ разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO) и Международной федерацией по молочному животноводству (IDF).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного документа, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в национальных (государственных) органах по стандартизации указанных выше государств.

Сведения о соответствии ссылочных межгосударственных стандартов международным стандартам приведены в приложении ДА.

Степень соответствия - идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1670-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO/TS15495/IDF/RM 230—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2014 года

6 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, 2014

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 Термины и определения.....1
4 Сущность метода.....1
5 Отбор проб.....2
6 Подготовка пробы для анализа.....2
7 Проведение анализа.....2
8 Критерии рабочих характеристик.....3
9 Протокол испытания.....3
Приложение А (справочное) Пример А — Коровье молоко и молочные смеси для детей раннего возраста. Одновременное количественное определение меламина и циануровой кислоты методом жидкостной хроматографии с ионизацией электрораспылением и тандемной масс-спектрометрии.....4
Приложение В (справочное) Пример В —Количественный анализ меламина и циануровой кислоты в сухой молочной смеси для детей раннего возраста и коровьем молоке методом жидкостной хроматографии с использованием линейной масс-спектрометрии с ионной ловушкой.....16
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных межгосударственных стандартов международным стандартам.....25

Введение

Международная организация по стандартизации ИСО (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов–членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам–членам на голосование. Для опубликования их в качестве международного стандарта требуется одобрение не менее 75 % комитетов–членов, принимающих участие в голосовании.

При других обстоятельствах, особенно при наличии настоятельных требований рынка, технический комитет может решить опубликовать другие типы нормативных документов:

- общедоступные технические условия ISO (ISO/PAS), представляющие собой соглашение между техническими экспертами рабочей группы ISO и публикуемые при условии получения одобрения более чем 50 % голосов членов головного технического комитета, принимавших участие в голосовании;
- технические условия ISO (ISO/TS), представляющие собой соглашение между членами технического комитета и публикуемые при условии утверждения 2/3 голосов членов комитета, принимавших участие в голосовании.

Документы ISO/PAS или ISO/TS пересматриваются через три года с целью принятия решения либо о продлении их действия на следующие три года, либо о пересмотре и публикации в качестве международного стандарта, либо прекращении действия. Если принимается решение о продлении действия ISO/PAS и ISO/TS, они должны быть пересмотрены через следующие три года, когда они должны быть либо преобразованы в международный стандарт, либо отменены.

Следует учитывать возможность того, что некоторые элементы международного стандарта могут быть предметом патентного права. ISO не несет ответственности за идентификацию любого из таких патентных прав.

Международный документ ISO/TS 15495 | IDF/RM 230 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34 «Пищевые продукты» подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» и Международной федерацией по молочному животноводству (IDF). Международный документ публикуется совместно с ISO и IDF.

IDF (Международной федерацией по молочному животноводству ММФ (IDF) является некоммерческой организацией, представляющей всемирное молочное производство. Членами IDF являются Национальные комитеты каждой страны–члена, а также региональные ассоциации по молочному животноводству, которые имеют подписанное официальное соглашение о совместной деятельности с IDF. Каждый член IDF имеет право быть представленным в постоянных комитетах IDF, осуществляющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO по вопросам разработки стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Основная задача постоянных комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Постоянными комитетами, рассылаются Национальным комитетам для утверждения до опубликования в качестве международных стандартов. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50 % национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы международных стандартов могут быть объектом патентных прав. IDF не должен нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO/TS 15495/IDF/RM 230 был подготовлен Международной молочной федерации IDF (ММФ) и Техническим комитетом ISO/TC 34 «Пищевые продукты» подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты». Опубликован совместно IDF и ISO.

Вся работа по разработке международного документа была выполнена совместной рабочей группой по Определению меламина постоянного комитета по Методам анализа добавок и примесей под руководством лидеров проекта, д-ра С.Е.Холройда (S.E.Holroyd) (Новая Зеландия) и д-ра Т.Делатуа (T. Delatour) (Швейцария).

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. МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИТАНИЕ ДЛЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Руководящие указания для количественного определения меламина и циануровой кислоты методом жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS)

Milk, milk products and infant formulae.
Guidelines for the quantitative determination of melamine and cyanuric acid by LC-MS/MS

Дата введения – 2014—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает руководящие указания для количественного определения меламина и циануровой кислоты в молоке, сухих молочных продуктах и питании для детей раннего возраста методом жидкостной хроматографии с ионизацией электрораспылением – тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS).

Примечание – Примеры методов LC-MS/MS приведены в приложениях А и В.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные документы обязательны для применения данного документа. Для датированных ссылок применяется только указанное издание. Для недатированных ссылок применяется самое последнее издание указанного документа (включая все изменения).

ISO 3534 (all parts) Statistics – Vocabulary and symbols (Статистика. Словарь и обозначения)

ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерения. Часть 1. Общие принципы и определения)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ISO 3534, ISO 5725-1, а также следующие термины с сооответствующими определениями.

3.1 **содержание меламина** (melamine content): Массовая доля вещества, определенная с помощью методов, установленных в настоящем стандарте.

Примечание – Содержание меламина выражают в миллиграммах на килограмм продукта.

3.2 **содержание циануровой кислоты** (cyanuric acid content): Массовая доля вещества, определенная с помощью методов, установленных в настоящем стандарте

Примечание – Содержание циануровой кислоты выражают в миллиграммах на килограмм продукта.

3.3 **максимальный предел** (maximum limit, ML): Максимальное содержание меламина или циануровой кислоты, допускаемое или приемлемое в молоке, продукции из сухого молока или молочных смесей для детей раннего возраста.

Примечание – ML может быть пределом, установленным на национальном, международном уровнях или на определенном уровне решения таких проблем.

4 Сущность метода

Пробу приводят в гомогенное состояние или разбавляют в случае порошкообразных проб. К пробе для анализа добавляют подходящий растворитель, чтобы осадить белки из матрицы и экстрагировать меламин и циануровую кислоту. После центрифугирования аликвотное количество надосадочной жидкости анализируют методом LC-MS/MS.

Издание официальное

Применительно к настоящему стандарту LC-MS/MS обозначает любой метод, соединяющий высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) или сверхпроизводительную жидкостную хроматографию (UPLC), либо с обнаружением на спектрометре с тремя квадрупольными линзами, либо с обнаружением на масс-спектрометре с ионной ловушкой. Хроматографическое разделение основано на жидкостной хроматографии с гидрофильном взаимодействием (HILIC), чтобы обеспечить хорошее разделение меламина и циануровой кислоты. Ионизация вещества сопровождается ионизацией электрораспылением (ESI), а детекторы функционируют в выбранном режиме мониторинга реакции (SRM).

Примечание – Можно использовать другие достаточно эффективные методы ионизации. Также можно использовать другие анализаторы массы, постольку поскольку они согласуются с критериями эффективности (идентификационные точки) по [1].

Количественное определение меламина и циануровой кислоты основано на разбавлении с использованием внутренних стандартов стабильного изотопа для обоих определяемых веществ (аналитов).

5 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в ISO 707/IDF 50 [2]. Важно, чтобы лаборатория получила действительно репрезентативную пробу, без повреждений и изменений в результате транспортирования или хранения.

6 Подготовка пробы для анализа

Масса пробы для анализа или дополнительного разбавления должна быть представительной для исследуемого продукта и позволять эффективную экстракцию определяемых веществ (аналитов).

Стандарты с мечеными изотопами следует вводить непосредственно в сухую или влажную пробу на первом этапе анализа.

Концентрация добавленных внутренних стандартов должна быть величиной такого же порядка, как концентрация меламина и циануровой кислоты. Экстракцию можно выполнить в объеме растворителя не менее 5 $см^3$ на грамм материала пробы, чтобы получить конечную массовую долю органического растворителя в экстракционной смеси не менее 70 %. Экстракцию следует вести в течение не менее 5 мин либо при энергичном встряхивании, либо с помощью ультразвука в сочетании с перемешиванием. Затем пробу центрифугируют в определенных условиях и фильтруют через шприцевой фильтр.

Можно применять другие способы при условии соответствия критериям эффективности и соответствия валидации требованиям, установленным в настоящем стандарте.

7 Проведение анализа

7.1 Анализ LC-MS/MS. Хроматография

Выполняют разделение с помощью жидкостной хроматографии, используя колонку, предназначенную для этой цели.

Минимальное приемлемое время удерживания для меламина и циануровой кислоты должно вдвое превосходить время удерживания, соответствующее свободному объему колонки. Время удерживания в экстракте пробы должно соответствовать времени удерживания калибровочного стандарта в пределах установленного интервала времени удерживания.

Отношение времени удерживания определяемого вещества (аналита) к времени удерживания внутреннего стандарта должно соответствовать отношению времени удерживания калибровочных стандартов к времени удерживания внутреннего стандарта в пределах $\pm$ 2,5 %.

7.2 Анализ LC-MS/MS. Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрическое определение меламина и циануровой кислоты должно осуществляться предпочтительно посредством применения прибора LC-MS/MS с тремя квадрупольными линзами.

Количественное определение и идентификация должны достигаться в режиме SRM. При использовании прибора с тремя квадрупольными линзами для каждого соединения, должно использоваться не менее двух MRM-переходов массы для определения аналита, тогда как не менее одного перехода должно использоваться для внутреннего стандарта. Также рекомендуется, чтобы

для внутреннего стандарта наблюдалось два MRM-перехода.

Наиболее подходящий переход (наиболее интенсивный) должен использоваться для количественного определения (квантификатор), а второй для подтверждения (квалификатор). Необходимо проверить отношение интенсивности квалификатора к интенсивности квантификатора (Rq/Q) и применить критерии допусков в зависимости от значения Rq/Q (таблица 1).

Таблица 1 — Коэффициент допустимого отклонения для отношения интенсивности квалификатора к интенсивности квантификатора (Rq/Q)

Rq/Q (% квантификатора)	Допуск (отн. в %)
>50	± 20
>20 до 50	± 25
>10 до 20	± 30
≤10	± 50

8 Критерии рабочих характеристик

8.1 Общие положения

Каждой лаборатории следует подтвердить вводимый метод, чтобы продемонстрировать соответствие поставленным целям. Для валидации рекомендуется процедура, установленная по [1]. Максимальные и минимальный пределы рабочих характеристик, взятых из этой процедуры, определены в 8.2 и 8.5.

8.2 Требуемая минимальная чувствительность

Требуемый предел квантификации (LoQ) должен быть не менее чем в 10 раз ниже максимального предела (ML), чтобы обеспечить надежный диапазон при ML.

8.3 Достоверность и воспроизведение

Следуя данному руководству, достоверность и воспроизведение обычно попадают в интервал между 95 % и 105 %. Для приемки аналитических методов правильность и выход должны быть в интервале между 80 % и 110 %.

8.4 Повторяемость

Коэффициент вариаций повторяемости обычно составляет от 3 % до 6 %, с пределом <15 %.

8.5 Внутрилабораторная воспроизводимость

Коэффициент вариаций внутрилабораторной воспроизводимости обычно составляет от 5 % до 10 %, с пределом <15 %.

9 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать, как минимум, следующую информацию:

a) все сведения, необходимые для полной идентификации пробы;

b) использованный метод отбора проб, если он известен;

c) использованный метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все детали процедур, не установленных в настоящем стандарте или считающихся необязательными, наряду с описанием всех событий, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

e) полученный(е) результат(ы) испытания;

f) если проверялась повторяемость (сходимость), то полученный конечный результат.

Приложение А
(справочное)

Пример А — Коровье молоко и сухие молочные смеси для детей раннего возраста. Одновременное количественное определение меламина и циануровой кислоты методом жидкостной хроматографии с ионизацией электрораспылением и тандемной масс-спектрометрии

А.1 Область применения

В данном приложении установлен подтвержденный внутри лаборатории метод количественного определения меламина и циануровой кислоты в коровьем молоке и сухих молочных смесей для детей раннего возраста методом жидкостной хроматографии с ионизацией электрораспылением и тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) с использованием режима мониторинга выбранных реакций.

Положительная идентификация меламина и циануровой кислоты в пробе проводится согласно критериям подтверждения по [1] .

Количественное определение осуществляют с помощью изотопного разбавления, используя меченый ($^{13}C_3$,$^{15}N_3$)-меламин и меченую ($^{13}C_3$,$^{15}N_3$)-циануровую кислоту в качестве внутренних стандартов (IS). Дополнительные технические подробности можно найти в данных валидации и результатах квалификационных испытаний, см. ссылку [3].

Метод позволяет осуществить точное количественное определение при следующих сообщаемых пределах, и более:

a) содержание меламина и циануровой кислоты в коровьем молоке при массовой концентрации от 0,05 до 0,10 мг/кг соответственно;

содержание меламина и циануровой кислоты в молочных смесях для детей раннего возраста при массовой концентрации от 0,05 мг/кг до 0,10 мг/кг, соответственно;

b) содержание меламина и циануровой кислоты в молочных смесях для детей раннего возраста при массовой концентрации 1,00 мг/кг.

А. 2 Термины и определения

См. раздел 3.

А. 3 Сущность метода

Методика анализа включает разбавление пробы в водном растворе ацетонитрила, что приводит к осаждению. После центрифугирования надосадочную жидкость анализируют методом LC-MS/MS в режиме SRM, работая как в режиме ионизации с получением положительных ионов, так и в режиме ионизации с получением отрицательных ионов. Переключение полярности выполняется в рамках одного опыта.

А. 4 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет иных указаний, и дистиллированную или деминерализованную воду или воду равноценной чистоты.

Примечание – Номера по CAS приведены для каждого реактива.

Перед использованием химических веществ см. соответствующие справочники или перечни безопасности, утвержденные в установленном порядке.

А.4.1 Вода для хроматографического анализа (CAS No. 7732-18-5).

А.4.2 Ацетонитрил (CH_3CN), градиентной чистоты для хроматографического анализа (CAS No. 75-05-8).

А.4.3 Ацетат аммония (CH_3COONH_4), GR для анализа (CAS No. 631-61-8).

А.4.4 Циануровая кислота $(CNOH)_3$, массовая доля >98 % (CAS No. 108-80-5).

А.4.4.1 Исходный стандартный раствор циануровой кислоты, массовой концентрацией 0,25 мг циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Берут навеску с точностью до 0,1 мг, 63,8 мг циануровой кислоты (А.4.4) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 250 $см^3$ (А.5.12), сделав соответствующую поправку на примеси согласно результатам анализа, приведенным в сертификате. Растворяют и доводят до метки водой (А.4.1). Примерно в течение 15 мин воздействуют ультразвуком до полного растворения.

Хранят исходный стандартный раствор циануровой кислоты при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий исходный стандартный раствор готовят еженедельно.

А.4.4.2 Рабочий раствор циануровой кислоты I, соответствующий массовой концентрации 20 мкг циануровой кислоты на кубический сантиметр .

Пипеткой добавляют 4 $см^3$ исходного стандартного раствора циануровой кислоты (А.4.4.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 $см^3$ (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Рабочий раствор I циануровой кислоты хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий рабочий раствор I готовят еженедельно.

А.4.4.3 Рабочий раствор циануровой кислоты II, соответствующий массовой концентрации 2 мкг циануровой кислоты на миллилитр.

Пипеткой добавляют 1 $см^3$ рабочего раствора 1 циануровой кислоты (А.4.4.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 10 $см^3$ (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Рабочий раствор II циануровой кислоты хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий рабочий раствор II готовят еженедельно.

А.4.4.4 Рабочий раствор циануровой кислоты III, соответствующий 200 нг циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Пипеткой добавляют 0,5 $см^3$ рабочего раствора циануровой кислоты I (А.4.4.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 $см^3$ (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Рабочий раствор III циануровой кислоты хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий рабочий раствор III готовят еженедельно.

А.4.5 Меченая циануровая кислота ($^{13}C_3H_3{}^{15}N_3O_3$), изотопная чистота: $^{13}C_3$ = 99 %; кольцо $^{15}N_3$ > 98 %; химическая чистота ≥ 90 % по массе, 100 мкг/$см^3$ в воде –1,2 $см^3$.

А.4.5.1 Исходный стандартный раствор меченой циануровой кислоты, соответствующий массовой концентрации 100 мкг меченой циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Готовый к применению исходный стандартный раствор меченой циануровой кислоты имеется в продаже. Хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Необходимо использовать IS (внутренний стандарт) одной и той же партии для приготовления стандартных градуировочных растворов, описанных в А.6.2, и введения в экстракты в соответствии с методикой экстракции, описанной в А.9.1.

А.4.5.2 Рабочий раствор меченой циануровой кислоты I, соответствующий массовой концентрации 20 мкг меченой циануровой кислоты на миллилитр.

Пипеткой добавляют 1 $см^3$ от исходного стандартного раствора меченой циануровой кислоты (А.4.5.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 5 $см^3$ (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Рабочий раствор меченой циануровой кислоты I хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте.

А.4.5.3 Рабочий раствор меченой циануровой кислоты II, соответствующий массовой концентрации 2 мкг меченой циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Пипеткой добавляют 0,5 $см^3$ рабочего раствора меченой циануровой кислоты I (А.4.5.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 5 $см^3$ (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Рабочий раствор меченой циануровой кислоты II хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте.

А.4.5.4 Рабочий раствор меченой циануровой кислоты III, соответствующий массовой концентрации 200 нг меченой циануровой кислоты на миллилитр.

Пипеткой добавляют 0,5 $см^3$ рабочего раствора меченой циануровой кислоты I (А.4.5.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 $см^3$ (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Рабочий раствор меченой циануровой кислоты III хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте.

А.4.6 Меламин ($C_3H_6N_6$), > 99 % по массе (CAS No. 108-78-1).

А.4.6.1 Исходный стандартный раствор меламина, соответствующий массовой концентрации 0,25 мг меламина на кубический сантиметр.

Взвешивают с точностью до 0,1 мг 62,5 мг меламина (А.4.6) и помещают в мерную колбу с одной меткой вместимостью 250 $см^3$ (А.5.12). Растворяют и доводят до метки водой (А.4.1). Обрабатывают ультразвуком в течение не менее 15 мин до полного растворения. Хранят при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий исходный раствор готовят еженедельно.

А.4.6.2 Рабочий раствор меламина I, соответствующий массовой концентрации 20 мкг меламина на миллилитр.

Пипеткой добавляют 4 см3 исходного стандартного раствора меламина (А.4.6.1) в мерную колбу

с одной меткой вместимостью 50 см^3 (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Хранят рабочий раствор меламина I при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий рабочий раствор меламина I готовят еженедельно.

А.4.6.3 Рабочий раствор меламина II, соответствующий массовой концентрации 2 мкг меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой добавляют 1 см^3 рабочего раствора меламина I (А.4.6.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 10 см^3 (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Хранят рабочий раствор меламина II при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий рабочий раствор меламина II готовят еженедельно.

А.4.6.4 Рабочий раствор меламина III, соответствующий массовой концентрации 200 нг меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой добавляют 0,5 см^3 рабочего раствора меламина I (А.4.6.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 см^3 (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Хранят рабочий раствор меламина III при комнатной температуре в защищенном от света месте. Свежий рабочий раствор меламина III готовят еженедельно.

А.4.7 Меченый меламин [$^{13}C_3N_3(^{15}NH_2)_3$], изотопная чистота: $^{13}C_3$=99 %; амино- $^{15}N_3$ = 98 %; химическая чистота ≥ 98 % по массе, 100 мг/см^3 в воде – 1,2 см^3, например, CNLM-8150-1.2[1)].

А.4.7.1 Исходный раствор меченого меламина, соответствующий концентрации 10 мкг меченого меламина на кубический сантиметр.

Хранят раствор при комнатной температуре в защищенном от света месте. Необходимо использовать IS (внутренний стандарт) одной и той же партии для приготовления стандартных градуировочных растворов в А.6.2 и введения в экстракты в соответствии с методикой экстракции, описанной в А.9.1.

А.4.7.2 Рабочий раствор меченого меламина I, соответствующий массовой концентрации 20 мкг меченого меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой добавляют 1 см^3 исходного раствора меченого меламина (А.4.7.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 5 см^3 (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Хранят рабочий раствор меченого меламина I при комнатной температуре в защищенном от света месте.

А.4.7.3 Рабочий раствор меченого меламина II, соответствующий массовой концентрации 2 мкг меченого меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой добавляют 0,5 см^3 рабочего раствора меченого меламина I (А.4.7.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 5 см^3 (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Хранят рабочий раствор меченого меламина II при комнатной температуре в защищенном от света месте.

А.4.7.4 Рабочий раствор меченого меламина III, соответствующий массовой концентрации 200 нг меченого меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой добавляют 0,5 см^3 рабочего раствора меченого меламина I (А.4.7.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 см^3 (А.5.12). Доводят до метки водой (А.4.1) и перемешивают. Хранят рабочий раствор меченого меламина III при комнатной температуре в защищенном от света месте.

А.5 Аппаратура

Стеклянная посуда (например мерные колбы, А.5.12), используемая для приготовления стандартных исходных и рабочих растворов, может загрязниться, особенно меламином, и требует очистки и промывки следующим образом:

a) стеклянную посуду моют вручную теплой водопроводной водой с лабораторным моющим средством;

b) стеклянную посуду вручную моют лабораторным ершиком;

c) тщательно споласкивают все стекло, включая стеклянные пробки теплой водопроводной водой, затем дистиллированной водой три раза;

d) споласкивают стеклянную посуду этиловым спиртом А и дают просохнуть на воздухе.

Используют обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

А.5.1 Конические пробирки из полипропилена, вместимостью 50 см^3.

А.5.2 Центрифуга, оснащенная ротором, приспособленная под пробирки вместимостью 50 см^3, с ускорением 4000 *g*.

А.5.3 Мерные пипетки вместимостью 0,5, 1 и 4 см^3, по ISO 835[4], класс А (или AS).

А.5.4 Автоматическая микропипетка по ISO 8655-2[5], точная, прецизионная, калиброванная

---

1)) CNLM-8150-1.2 – это торговая марка продукции, поставляемой лабораториями изотопов при Кембридже. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящим стандартом и не свидетельствует о предпочтении в отношении данного продукта. Можно использовать аналогичные продукты, при условии получения равноценных результатов.

пользователем.

А.5.5 Нейлоновый шприцевой фильтр, пористость 0,22 мкм.

А.5.6 Система дегазации (если она не является частью оборудования для LC-MS/MS).

А.5.7 Аналитические весы, обеспечивающие считывания с точностью до 0,1 мг.

А.5.8 Устройство для ультразвуковой обработки.

А.5.9 Пробирки.

А.5.10 Оборудование для LC-MS/MS.

HPLC Agilent 1100[1)] в сочетании с масс-спектрометром 4000 QTrap[2)] с тремя квадрупольными линзами, оснащенный источником ионизации Turbolon Spray®[2)].

А.5.11 Колонка HPLC, TSKgel Amide-80[3)], диаметр 2,0 мм, длина 250 мм, ВД 5 мкм.

А.5.12 Мерные колбы с одной меткой, вместимостью 5, 10, 50, 100 , 250 и 1000 см^3 по ISO 1042[6], класс А.

А. 6 Подготовка реактивов

А. 6.1 Водный раствор ацетонитрила [соотношение 70 (ацетонитрил) + 30 (вода)]

С помощью мерных цилиндров переносят 70 см^3 ацетонитрила (А.4.2) и 30 см^3 воды (А.4.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 см^3 (А.5.12) и перемешивают. Хранят при комнатной температуре в течение не более одной недели.

А .6.2 Калибровочные кривые для меламина и циануровой кислоты

А. 6.2.1 Стандартные растворы меламина и циануровой кислоты (от 0 до 2,00 мг/дм^3) с соответствующими IS (внутренними стандартами) (при уровне 1,00 мг/дм^3)

Готовят по отдельности пять смешанных стандартных растворов, каждый в мерной колбе с одной меткой вместимостью 5 см^3 (А.5.12) в диапазоне концентраций от 0 до 2,00 мг/дм^3 и добавляют соответствующий IS (внутренний стандарт) на уровне 1,00 мг/дм^3, как показано в таблице А.1.

Хранят пять полученных стандартных растворов при температуре 4 °С в защищенном от света месте.

Т а б л и ц а А.1 — Стандартные смеси меламина и циануровой кислоты в соотношении 1 : 5

Наименование показателя	Стандартный раствор				
	1	2	3	4	5
Рабочий раствор меламина II (А.4.6.3), мкл	0	25	50	75	100
Рабочий раствор циануровой кислоты II (А.4.4.3), мкл	0	25	50	75	100
Рабочий раствор меченого меламина II (А.4.7.3), мкл	50	50	50	50	50
Рабочий раствор меченой циануровой кислоты II (А.4.5.3), мкл	50	50	50	50	50
Раствор ацетонитрил-вода (А.6.1), мкл	4 900	4 850	4 800	4 750	4 700
Это соответствует:					
концентрации аналитов в сумме, нг/см^3	0	10	20	30	40
концентрации IS в сумме, нг/см^3	20	20	20	20	20
содержанию аналитов (эквивалентно пробе), мг/кг	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
содержанию IS (эквивалентно пробе), мг/кг	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

1) HPLC Agilent 1100 это торговое наименование прибора, поставляемого Agilent. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящим стандартом и не свидетельствует о предпочтении в отношении данной продукции. Можно использовать аналогичную продукцию при условии получения равноценных результатов.

2) 4000 QTrap и Turbulon Spray это торговые наименования приборов, поставляемых Applied Biosystems. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящим стандартом и не свидетельствует о предпочтении со стороны ISO или IDF в отношении данной продукции. Можно использовать аналогичную продукцию при условии получения равноценных результатов.

3) TSKgel Amide-80 это торговое наименование прибора, поставляемого Tosoh Bioscience. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящим стандартом и не свидетельствует о предпочтении в отношении данной продукции. Можно использовать аналогичную продукцию при условии получения равноценных результатов.

А. 6.2.2 Стандартные растворы меламина (от 0 до 0,20 мг/дм^3) и циануровой кислоты (от 0 до 0,30 мг/дм^3) с соответствующими IS (внутренними стандартами) (на уровне 0,10 мг/дм^3)

Готовят по отдельности пять смешанных стандартных растворов, каждый в мерной колбе с одной меткой вместимостью 5 см^3 (А.5.12), в диапазоне концентраций меламина от 0 до 0,20 мг/дм^3 и в диапазоне массовых концентраций циануровой кислоты от 0 до 0,30 мг/дм^3 с соответствующим IS (внутренний стандарт) для обоих аналитов, добавленных при концентрации 0,10 мг/дм^3, как показано в таблице А.2.

Хранят полученные стандартные растворы при температуре 4 °С в защищенном от света месте.

Т а б л и ц а А.2 — Стандартные смеси меламина и циануровой кислоты в соотношении 6 : 10

Наименование показателя	Стандартные растворы				
	6	7	8	9	10
Рабочий раствор меламина III (А.4.6.4), мкл	0	25	50	75	100
Рабочий раствор циануровой кислоты III (А.4.4.4), мкл	0	50	75	100	150
Рабочий раствор меченого меламина III (А.4.7.4), мкл	50	50	50	50	50
Рабочий раствор меченой циануровой кислоты III (А.4.5.4), мкл	50	50	50	50	50
Раствор ацетонитрил-вода (А.6.1), мкл	4 900	4 825	4 775	4 725	4 650
Это соответствует:					
концентрации меламина, нг/см^3	0	1	2	3	4
концентрации циануровой кислоты, нг/см^3	0	2	3	4	6
концентрации IS (меламина или циануровой кислоты), нг/см^3	2	2	2	2	2
содержанию меламина (эквивалентно пробе), мг/кг	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
содержанию циануровой кислоты (эквивалентно пробе), мг/кг	0,00	0,10	0,15	0,20	0,30
содержанию IS (меламин и циануровая кислота, эквивалентно пробе), мг/кг	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

А. 6.3 Растворы для жидкостной хроматографии

А..6.3.1 Подвижная фаза А: водный раствор ацетата аммония, 10 ммоль/см^3.

Переносят 0,77 г ацетата аммония (А.4.3) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 1 000 см3 (А.5.12). Растворяют в ~50 см^3 воды (А.4.1). Доводят до метки водой и перемешивают. Фильтруют раствор через фильтр пористостью 0,22 мкм.

А.6.3.2 Подвижная фаза В: ацетонитрил.

Используют ацетонитрил специальной марки для хроматографии (HPLC) (А.4.2).

А.7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в данном приложении. Рекомендуемый метод отбора проб описан в ISO 707/IDF 50[2].

Важно, чтобы в лаборатории была получена репрезентативная проба, которая не претерпела повреждений и изменений в процессе транспортирования и хранения.

Сырое молоко хранят при температуре 4 °С или в замороженном состоянии, если анализ не будет проводиться непосредственно по получении.

А. 8 Подготовка проб для анализа

А. 8.1 Сухая молочная смесь для детей раннего возраста

Готовят гомогенную лабораторную пробу путем переноса ее в емкость для пробы вместимостью, в два раза превышающей объем лабораторной пробы. Немедленно закрывают емкость.

Тщательно перемешивают, многократно встряхивая и переворачивая емкость.

А .8.2 Коровье молоко

Доводят пробу до комнатной температуры. Перед тем, как взять навеску для анализа, убеждаются, что проба гомогенная осторожным перевертыванием емкости несколько раз.

А. 9 Проведение анализа

А. 9.1 Методика экстракции

Взвешивают с точностью до 0,01 г, 1 г коровьего молока (А.8.2) или сухой молочной смеси (А.8.1) в конической пробирке вместимостью 50 см^3 (А.5.1).

а) Вплоть до концентрации 2 мг/кг долей меламина и циануровой кислоты с тем и другим внутренними стандартами, добавленными в концентрации 1 мг/кг, вносят в навеску для анализа 50 мкл рабочего раствора меченого меламина I (А.4.7.2) и 50 мкл рабочего раствора меченой циануровой кислоты I (А.4.5.2). Тщательно перемешивают, пока внесенные объемы полностью не абсорбируются матрицей.

b) Для уровней содержания меламина до 0,2 мг/кг и циануровой кислоты до 0,3 мг/кг с тем и другим внутренними стандартами, добавленными в концентрации 0,1 мг/кг вносят в пробу для анализа 50 мкл рабочего раствора меченого меламина II (А.4.7.3) и 50 мкл рабочего раствора меченой циануровой кислоты II (А.4.5.3). Тщательно перемешивают, пока внесенные объемы полностью не абсорбируются матрицей.

Затем добавляют 5 $см^3$ воды (А.4.1) в коническую пробирку, подготовленную либо как в а), либо как в b). Перемешивают, так чтобы в пробе не оставалось сгустков. Добавляют 5 $см^3$ ацетонитрила (А.4.2). Энергично встряхивают в течение не менее 1 мин.

Добавляют 30 $см^3$ ацетонитрила (А.4.2) и 10 $см^3$ воды (А.4.1). Энергично встряхивают в течение не менее 5 мин, так чтобы в пробе не оставалось сгустков. В идеале лучше использовать автоматический шейкер. Центрифугируют полученный раствор при ускорении 4000 *g* при комнатной температуре в течение 10 мин, чтобы получить прозрачную надосадочную жидкость.

Если надосадочная жидкость не будет прозрачной, переносят аликвотное количество жидкости в другую пробирку и снова центрифугируют при 8500*g* при комнатной температуре в течение не менее 10 мин, используя настольную центрифугу.

Переносят от 0,5 до 1 $см^3$ прозрачной надосадочной жидкости в пробирку для хроматографического анализа. Продолжают анализ LC-MS/MS (А.9.3).

А. 9.2 Холостой опыт

Чтобы компенсировать, при необходимости, загрязнение меламином и циануровой кислотой в процессе подготовки пробы, используют холостую пробу, подготовленную без добавления матрицы. Анализируют холостую пробу наряду с каждой серией обычных проб.

А. 9.3 Анализ LC-MS/MS

А .9.3.1 Условия HPLC (ВЭЖХ)

Подвижная фаза А: раствор ацетата аммония (А.6.3.1);
подвижная фаза В: ацетонитрил(А.6.3.2);
вводимый объем: 5 мкл;
колонка: TOSOH TSKgel Amide-80, диаметр 2,0 мм, длина 250 мм, внутренний диаметр 5 мкм;
температура: комнатная температура;
скорость потока: 0,25 $см^3$/мин;
градиент: градиент LC как описано в таблице А.3;
отводной клапан: поток HPLC направляется на детектор масс-спектрометра в течение от 3,0 до 13,5 мин

Таблица А.3 — Градиент LC, используемый для анализа меламина и циануровой кислоты

Время, мин	A, %	B, %
0	10	90
8	10	90
13	65	35
14	90	10
15	90	10
15,5	10	90
25	10	90

В таких условиях время удерживания циануровой кислоты составляет ~ 6,4 мин, а время удерживания меламина ~ 11,5 мин (см. рисунки А.1–А.3).

А. 9.3.2 Параметры MS (масс-спектрометрии)

Параметры MS получают посредством ввода шприцем со скоростью 5 мкл/мин по отдельности рабочий раствор меламина I (А.4.6.2) и рабочий раствор циануровой кислоты I (А.4.4.2), оба в концентрации 20 мкг/$см^3$, в поток HPLC со скоростью 0,25 $см^3$/мин, используя Т-образный соединитель. Поток HPLC составляет 50 % подвижной фазы А (А.6.3.1) и 50 % подвижной фазы В (А.6.3.2). Таблицы А.4–А.6 дают рабочие условия приборов для анализа меламина и циануровой кислоты.

Таблица А.4 — Типичные параметры MS для меламина

Параметр	Применяемый прибор Biosystems Sciex 4000 QTrap
Тип ионизации	Электрораспыление (ESI)
Напряжение электрораспыления	3,5 кВ
Полярность	Положительные ионы
Температура блока источника ионизации	500 С
Газ	Защитный газ: 69 кПа (10 psl (фунтов на дюйм); газ источника ионов 1: 207 л3кПа (30 фунтов на дюйм); газ источника ионов 2: 207 кПа (30 фунтов на дюйм)
Потенциал декластеризации (DP)	60 В
Потенциал на входе (EP)	10 В
Потенциал столкновений на выходе (CXP)	15 А
Давление газа CID (SRM)	0,8 Па (6 мTorr), азот
Ширина пика (для каждого перехода)	0,5 Th
Разрешение	Единица (обе квадрупольные линзы)
Время сканирования (для каждого перехода)	100 мс
Переключение положительный/отрицательный в тройнике Т	8 мин

Таблица А.5 — Типичные параметры MS для циануровой кислоты

Параметр	Применяемый прибор Biosystems Sciex 4000 QTrap
Тип ионизации	Электрораспыление (ESI)
Напряжение электрораспыления	3,5 кВ
Полярность	Отрицательные ионы
Температура блока источника ионизации	500 °С
Газ	Защитный газ: 69 кПа (10 фунтов на дюйм); газ источника ионов 1:207 кПа (30 фунтов на дюйм); газ источника ионов 2:207 кПа (30 фунтов на дюйм)
Потенциал декластеризации (DP)	40 В
Потенциал на входе (EP)	10 В
Потенциал столкновений на выходе (CXP)	15 В
Давление газа CID (SRM)	0,8 Па (6 мТорр, азот)
Ширина пика (для каждого перехода)	0,7 Th
Разрешение	Единица (обе квадрупольные линзы)
Время сканирования (для каждого перехода)	100 мс
Переключение положительный/отрицательный в тройнике Т	8 мин

Таблица А.6 — Реакции перехода, наблюдаемые для анализа меламина и циануровой кислоты и их соответствующих внутренних стандартов (IS) и соотношения площадей пиков с допустимым пределом приемки по [1]

Аналит	Реакции перехода (m/z)[a] для:		Отношение площадей пиков ± предел(%)
	количественного определения	подтверждения аналита	
Меламин	127,0 → 85,1 (26)	127,0 → 68,0 (45)	0,28 ± 25
Меченый меламин [$^{13}C_3N_3(^{15}NH_2)_3$] (IS)	133,0 → 89,1 (26)	133,0 → 71,1 (45)	0,19 ± 25
Циануровая кислота	128,0 → 42,1 (30)	128,0 → 85,2 (14)	0,55 ± 20
Меченая циануровая кислота ($^{13}C_3H_3{}^{15}N_3O_3$) (IS)	134,0 → 44,1 (30)	134,0 → 88,9 (14)	0,52 ± 20

[a] Энергия столкновений (в электрон-вольтах) приведена в скобках.

Примечание – В зависимости от используемого детектора MS, соотношения площадей пиков по диагностическим реакциям перехода могут отличаться от приведенных в таблице А.6.

А .9.3.3 Тест-контроль прибора

Необходимо убедиться, что аппаратура LC-MS/MS работает в таких условиях, в которых метод остается соответствующим назначению. Это включает ввод калибранта низкой концентрации (например, стандартного раствора 7, таблица А.2) для проверки адекватности чувствительности прибора.

А 9.4 Калибровка и анализ проб

Количественно меламин и циануровая кислота определяют с помощью внешней калибровки. Вводят стандартные растворы (А.6.2.1 или А.6.2.2) в каждой серии обычных проб.

А 9.5 Подтверждение

Меламин и циануровая кислота считаются идентифицированными в пробе, если выполняются все критерии подтверждения а) – с) строго в соответствии с определениями по [1]

а) Сигнал обнаруживается при двух диагностических реакциях перехода, выбранных для каждого аналита и при двух диагностических реакциях перехода, выбранных для их соответствующих внутренних стандартов (IS). Отношение сигнал-шум для каждого диагностического иона должно быть ≥ 3:1;

b) Отношение хроматографического времени удерживания аналита к времени удерживания соответствующего внутреннего стандарта, т.е. относительное время удерживания аналита, соответствует отношению усредненного времени удерживания градуировочных растворов в пределах ± 2,5 % допуска;

c) Соотношение площадей пиков от различных реакций перехода, записанных для каждого аналита находится в пределах допусков, установленных критериями по [1], приведенными в таблице А.6.

А.10 Расчеты и обработка результатов

А.10.1 Расчеты

Соответствующее программное обеспечение облегчает построение шаблона на заказ, который затем служит для проверки линейности градуировочных кривых, чтобы рассчитать отношения площадей пиков, полученных по различным реакциям перехода (как определено в Таблице А.6), чтобы подтвердить присутствие или отсутствие аналитов, и дать окончательные результаты, выраженные в миллиграммах на килограмм.

Примечание – Градуировочная кривая будет такого типа:

$$\alpha = bw + a ,$$

где α – отношение площадей;

b – наклон;

w – массовая доля;

a – отсекаемый отрезок.

Рассчитывают содержание аналита w_a, мг/кг (где аналитом является меламин, $w_a = w_m$; где аналитом является циануровая кислота, $w_a = w_c$), используя следующее уравнение:

$$w_a = \frac{(A_a / A_{IS}) - a}{b} \times \frac{m_{IS}}{m_a \times 1\,000} ,$$

где A_a – площадь пика аналита в пробе;

A_{IS} – площадь пика внутреннего стандарта (IS) в пробе;

a – отсекаемый отрезок линии регрессии для реакции перехода, используемой для количественного определения;

b – наклон линии регрессии для реакции перехода, используемой для количественного определения;

m_{IS} – масса, в нанограммах, внутреннего стандарта (IS), добавленного в пробу для анализа (А.9.1);

m_a – масса, в граммах, пробы для анализа (А.9.1).

А. 10.2 Обработка результатов

Результаты выражают для аналита(ов) с точностью до второго знака после запятой.

А. 11 Показатели точности метода

А .11.1 Линейность

Тестируемые диапазоны линейности представлены в перечислениях а) и b):

a) меламин: от 0 до 0,20 мг/кг и от 0 до 2,00 мг/кг (эквивалентно содержанию в пробах) соответственно;

b) циануровая кислота: от 0 до 0,30 мг/кг и от 0 до 2,00 мг/кг (эквивалентно содержанию в пробах) соответственно.

Калибровка следует линейной модели, остатки равномерно распределены, а коэффициенты отклика стабильны в рассматриваемых диапазонах массовых долей.

А .11.2 Пределы обнаружения

LoD (отношение сигнал-шум, равное 3) составляют 0,03 мг/кг для меламина и 0,05 мг/кг для циануровой кислоты соответственно, как в коровьем молоке, так и в сухой молочной смеси.

А. 11.3 Предел квантификации

LoQ составляют 0,05 мг/кг для меламина и 0,10 мг/кг для циануровой кислоты, соответственно, как в коровьем молоке, так и в сухой молочной смеси.

А. 11.4 Пределы принятия решения и возможности выявления в сухой молочной смеси (PIF)

Предполагая, что максимальный предел (ML) составляет 1 мг/кг в PIF, пределы принятия решения, w_{CC_α}, и возможности выявления, w_{CC_β}, представлены в перечислениях а) и b):

a) для меламина: w_{CC_α} = 1,03 мг/кг, w_{CC_β} = 1,05 мг/кг;

b) для циануровой кислоты: w_{CC_α} = 1,04 мг/кг, w_{CC_β} = 1,09 мг/кг.

А .11.5 Эффективность

Как для меламина, так и для циануровой кислоты, эффективность, скорректированная по внутренним стандартам, была в диапазоне от 99 % до 116 %.

А. 11.6 Прецизионность

Значения для предела относительной повторяемости и предела относительной внутрилабораторной воспроизводимости были получены в ходе небольшого межлабораторного исследования на базе ISO 5725-1 и ISO 5725-2 [7], но не соответствовали всем требованиям.

А .11.6.1 Предел относительной повторяемости

Типичные значения относительной повторяемости, полученные методом, описанным в настоящем стандарте, приведены в таблице А.7.

Таблица А.7 — Типичные значения относительной повторяемости

Аналит	Матрица	Относительное значение повторяемости, %	Диапазон содержания, мг/кг
Меламин	СМ	6	От 0,05 до 0,15
	PIF	12	От 0,05 до 0,15
	PIF	4	От 0,5 до 1,5
Циануровая кислота	СМ	8	От 0,1 до 0,2
	PIF	11	От 0,1 до 0,2
	PIF	5	От 0,5 до 1,5

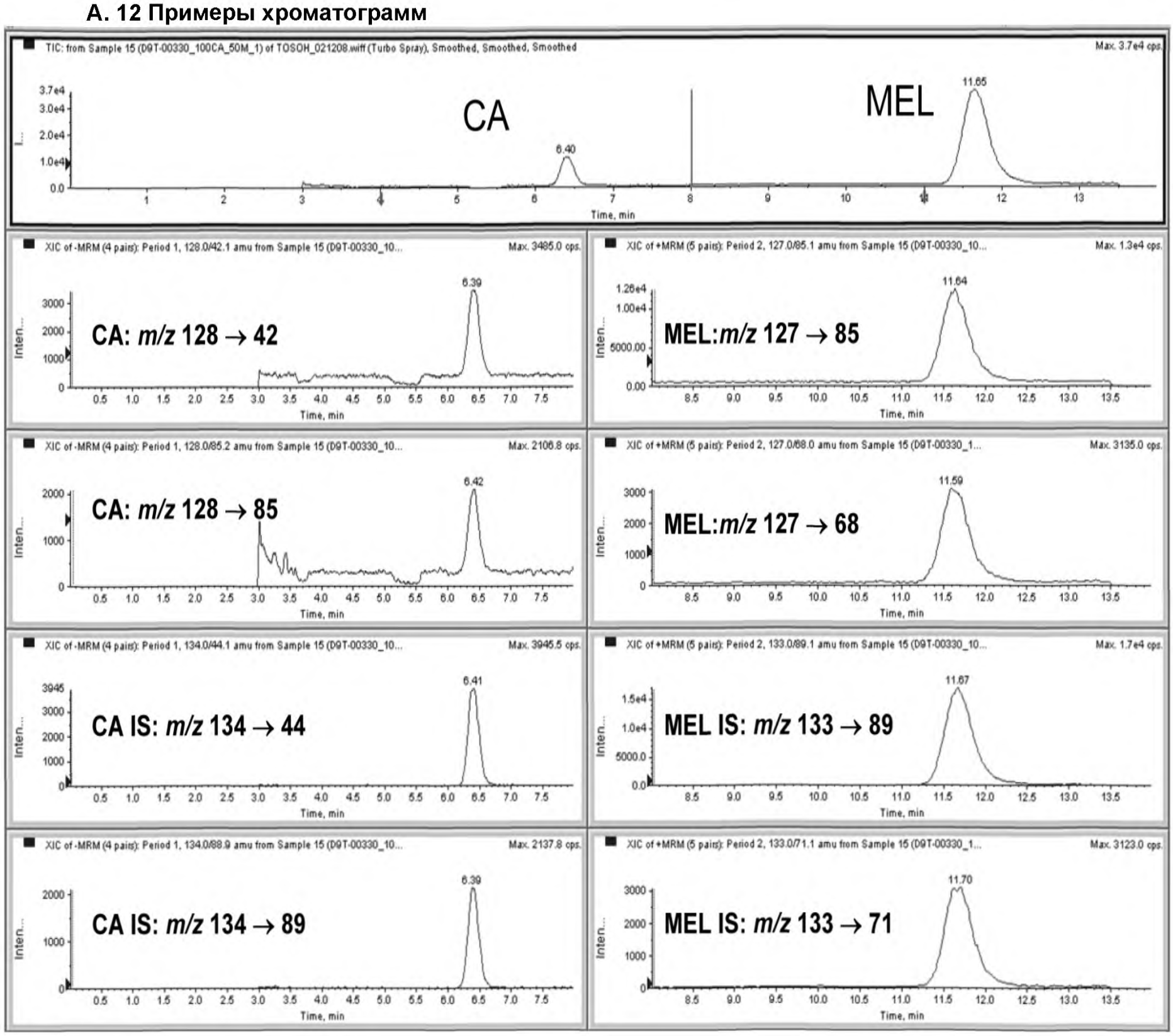
А.11.6.2 Предел относительной внутрилабораторной воспроизводимости

Типичные значения относительной внутрилабораторной воспроизводимости, полученные методом, описанном в настоящем стандарте, приведены в таблице А.8.

Таблица А.8 — Типичные значения относительной внутрилабораторной воспроизводимости

Аналит	Матрица	Относительная внутрилабораторная воспроизводимость, %	Диапазон содержания, мг/кг
Меламин	СМ	13	От 0,05 до 0,15
	PIF	15	От 0,05 до 0,15
	PIF	6	От 0,5 до 1,5
Циануровая кислота	СМ	10	От 0,1 до 0,2
	PIF	31	От 0,1 до 0,2
	PIF	13	От 0,5 до 1,5

А. 12 Примеры хроматограмм



Примечание – m/z – массовые числа ионов.

Рисунок А.1 — Пример хроматограмм LC-MS/MS меламина (MEL) и циануровой кислоты (CA) из экстракта коровьего молока, меченого изотопами, при концентрации меток: MEL = 0,05 мг/кг (IS = 0,1 мг/кг); CA = 0,10 мг/кг (IS = 0,1 мг/кг)

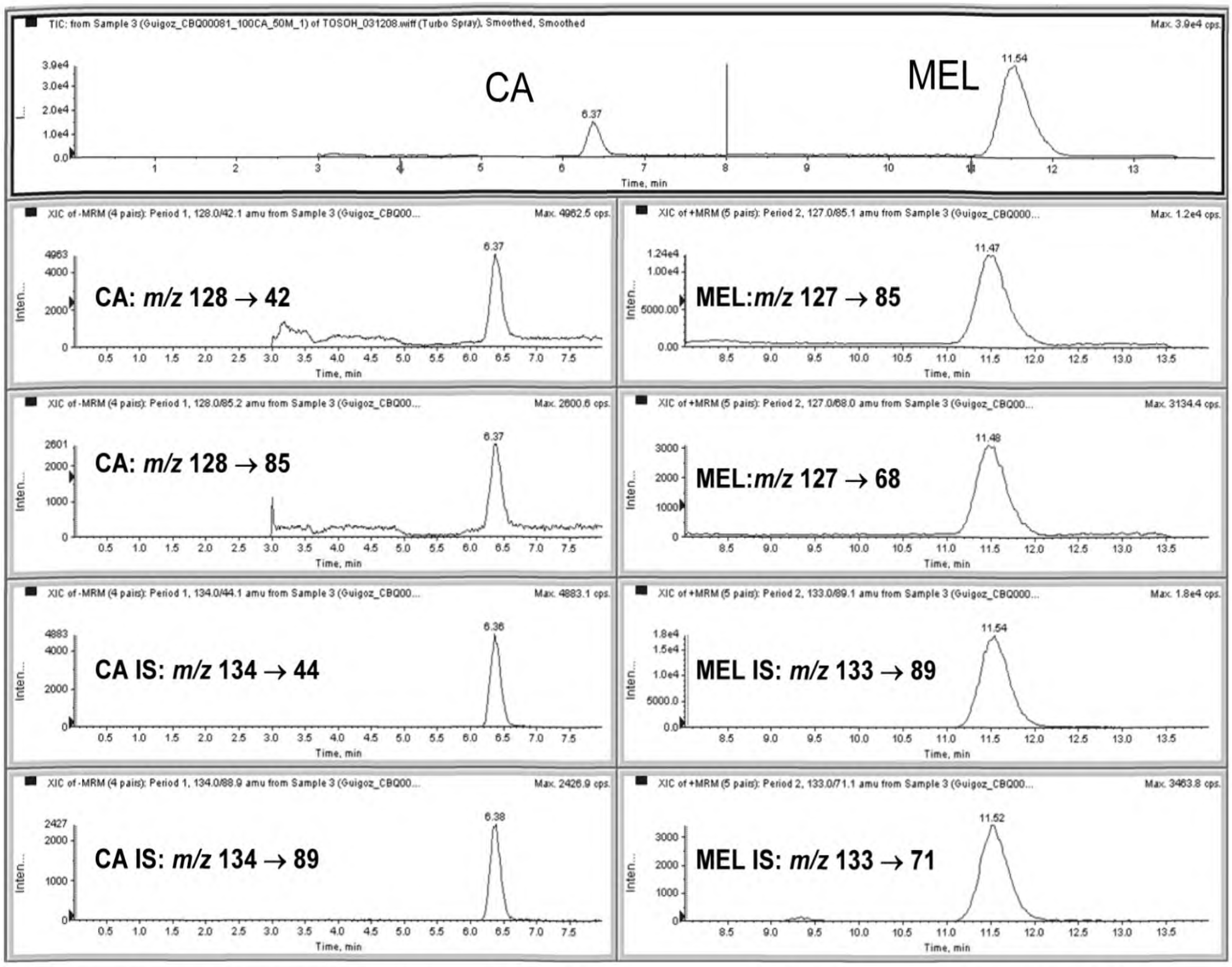


Рисунок А.2 — Пример хроматограмм LC-MS/MS меламина (MEL) и циануровой кислоты (CA) из экстракта меченой сухой молочной смеси для детей раннего возраста при концентрации меток: MEL 0,05 мг/кг (IS 0,1 мг/кг); CA 0,10 мг/кг (IS 0,1 мг/кг)

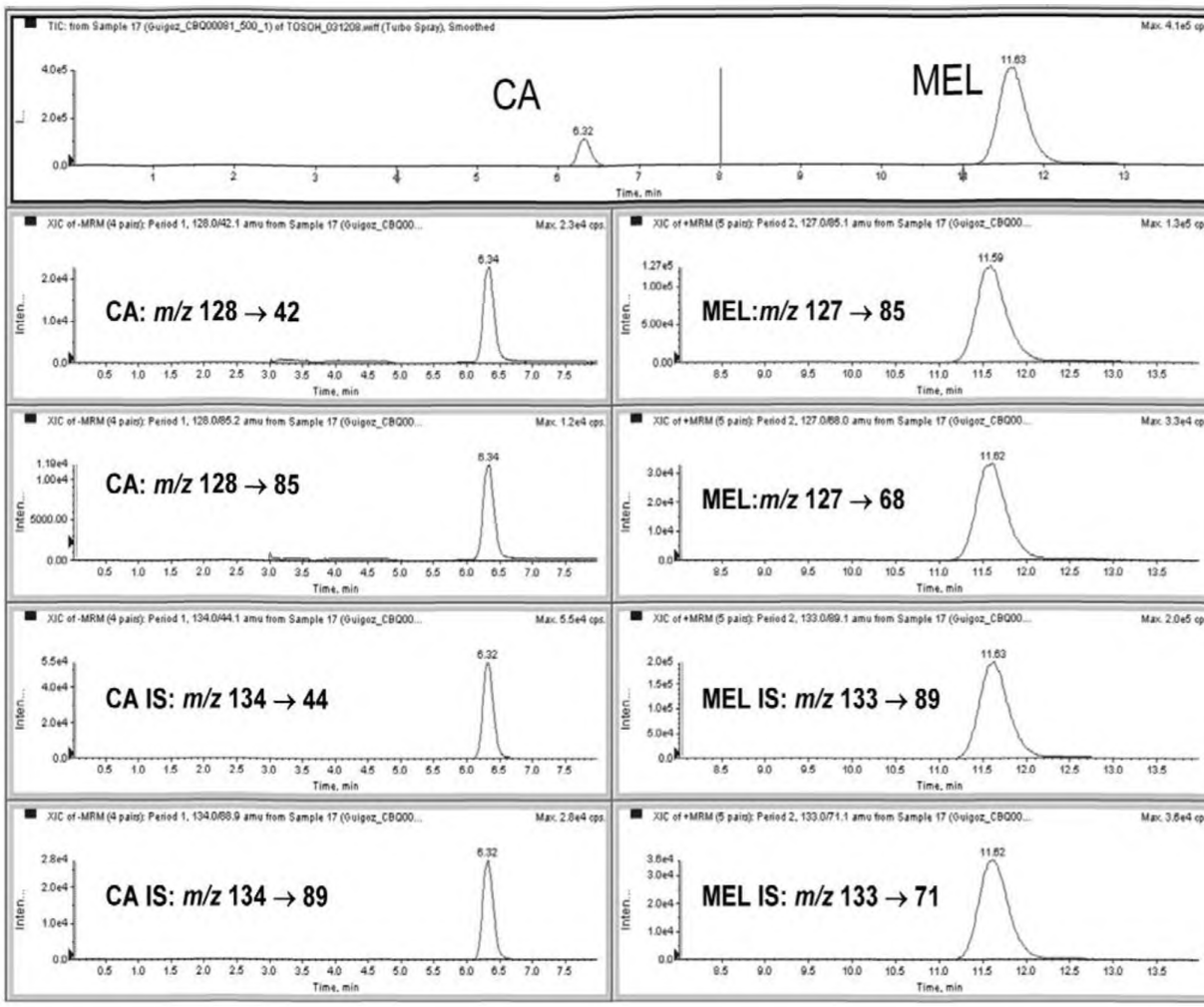


Рисунок А.3 — Пример хроматограмм LC-MS/MS меламина (MEL) и циануровой кислоты (CA) из экстракта меченой сухой молочной смеси для детей раннего возраста при концентрации меток: MEL 0,50 мг/кг (IS 1,0 мг/кг); CA 0,50 мг/кг (IS 1,0 мг/кг)

А.13 Протокол испытания

Протокол испытания методом А должен включать по крайней мере следующую информацию:

a) все сведения, необходимые для полной идентификации пробы;

b) использованный метод отбора проб, если он известен;

c) использованный метод испытания со ссылкой на данное приложение (ISO/TS 15495/IDF/RM 230:2010, приложение А);

d) подробное описание процедур, не установленных в данном приложении или рассматриваемых, как дополнительные, напряду с описанием всех случайностей, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

e) полученный результат(ы) испытания;

f) если проверялась повторяемость (сходимость), то конечный результат.

Приложение В
(справочное)

Пример В — Количественный анализ меламина и циануровой кислоты в сухой молочной смеси для детей раннего возраста и коровьем молоке методом жидкостной хроматографии с использованием линейной масс-спектрометрии с ионной ловушкой

В.1 Область применения

Данное приложение устанавливает метод, включающий определение меламина и циануровой кислоты в сухой молочной смеси для детей раннего возраста и в коровьем молоке с использованием метода линейной тандемной масс-спектрометрии с ионной ловушкой (LC-MS/MS), с источником ионизации электрораспылением в режиме мониторинга выбранных реакций (SRM). Количественное определение выполняется с помощью изотопного разбавления, используя меченые ($^{13}C_3$, $^{15}N_3$)-меламин и меченую ($^{13}C_3$, $^{15}N_3$)-циануровую кислоту в качестве внутренних стандартов(IS).

В.2 Термины и определения

См. раздел 3.

В.3 Сущность метода

Меланин и циануровую кислоту одновременно экстрагируют в ацетонитрил, осаждая белки. После центрифугирования надосадочную жидкость берут для последующего анализа LC-MS/MS с ионной ловушкой в режиме SRM. Меламин и циануровую кислоту анализируют отдельно в положительном и отрицательном режимах соответственно.

В.4 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет иных указаний, и дистиллированную или деминерализованную воду или воду аналогичной чистоты.

Примечание – Номера по CAS приведены для каждого реактива.

Перед использованием химических веществ см. соответствующие справочники или перечни безопасности, утвержденные местными органами.

В.4.1 Вода, для хроматографического анализа (CAS No. 7732-18-5).

В.4.2 Ацетонитрил (CH_3CN), градиентной чистоты для хроматографического анализа (CAS No. 75-05-8).

В.4.3 Ацетат аммония (CH_3COONH_4), GR для анализа (CAS No. 631-61-8).

В.4.4 Раствор муравьиной кислоты (CH_2O_2), соответствующий 1 % кислоты по объему (CAS No. 64-18-6).

Пипеткой добавляют 10 $см^3$ муравьиной кислоты (CAS No. 64-18-6, марки ACS) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 $см^3$ (В.5.8). Доводят до метки водой (В.4.1) и перемешивают.

В.4.5 Циануровая кислота ($(CNOH)_3$, массовая доля, > 98 % (CAS No. 108-80-5).

В.4.5.1 Исходный стандартный раствор циануровой кислоты, соответствующий массовой концентрации 0,1 мг циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Берут навеску с точностью до 0,1 мг, 20 мг циануровой кислоты (В.4.5) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 200 $см^3$ (В.5.8). Растворяют и доводят до метки раствором муравьиной кислоты (В.4.4). Обрабатывают ультразвуком до полного растворения в течение 10 мин.

Исходный стандартный раствор циануровой кислоты можно хранить до 10 сут при температуре 4°С. Свежий исходный стандартный раствор готовят каждые 10 дней.

В.4.5.2 Рабочий раствор циануровой кислоты, соответствующий концентрации 10 мкг циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Пипеткой приливают 10 $см^3$ исходного стандартного раствора циануровой кислоты (В.4.5.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 $см^3$ (В.5.8). Доводят до метки раствором муравьиной кислоты (В.4.4). Обрабатывают ультразвуком до полного растворения в течение не менее 10 мин.

Рабочий раствор циануровой кислоты можно хранить до 10 сут при температуре 4 °С. Свежий исходный стандартный раствор готовят каждые 10 дней.

В.4.6 Меченая циануровая кислота ($^{13}C_3H_3{}^{15}N_3O_3$), изотопная чистота: $^{13}C_3$ = 99 %; кольцо $^{15}N_3$ > 98 %; химическая чистота 90 % по массе, 100 мкг/$см^3$ в воде – 1,2 $см^3$.

В.4.6.1 Исходный стандартный раствор меченой циануровой кислоты, соответствующий концентрации 100 мкг меченой циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Исходный стандартный раствор меченой циануровой кислоты можно купить в готовом для использования виде в Лаборатории Изотопов при Кембридже (Cambridge Isotope Laboratories)[1)] (чистота 90 % по массе). Хранят этот исходный раствор при комнатной температуре в защищенном от света месте.

В.4.6.2 Рабочий раствор меченой циануровой кислоты, соответствующий массовой концентрации 10 мкг меченой циануровой кислоты на кубический сантиметр.

Пипеткой приливают 1,1 $см^3$ исходного стандартного раствора меченой циануровой кислоты (В.4.6.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 10 $см^3$ (В.5.8). Доводят до метки раствором муравьиной кислоты (В.4.4) и перемешивают.

Рабочий раствор меченой циануровой кислоты используют в качестве внутреннего стандарта IS. Хранят раствор при температуре 4°С.

В.4.7 Меламин ($C_3H_6N_6$), массовая доля > 98 % (CAS No. 108-78-1).

В.4.7.1 Исходный стандартный раствор меламина, соответствующий массовой концентрации 0,1 мг меламина на кубический сантиметр.

Взвешивают с точностью до 0,1 мг, 20 мг меламина (Б.4.7) и переносят в мерную колбу с одной меткой вместимостью 200 мл (Б.5.8). Растворяют и доводят до метки раствором муравьиной кислоты (Б.4.4). Обрабатывают ультразвуком до полного растворения в течение не менее 10 мин.

Исходный стандартный раствор меламина можно хранить до 10 сут при температуре 4 °С. Готовят свежий исходный стандартный раствор каждые 10 дней.

В.4.7.2 Рабочий раствор меламина I, соответствующий массовой концентрации 10 мкг меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой приливают 10 $см^3$ исходного стандартного раствора меламина (В.4.7.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 $см^3$ (В.5.8). Доводят до метки раствором муравьиной кислоты (В.4.4). Обрабатывают ультразвуком до полного растворения в течение не менее 10 мин.

Рабочий раствор меламина I можно хранить до 10 сут при температуре 4 °С. Готовят свежий рабочий раствор I каждые 10 дней.

В.4.7.3 Рабочий раствор меламина II, соответствующий массовой концентрации 1 мкг меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой приливают 1 $см^3$ исходного стандартного раствора меламина I (В.4.7.2) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 10 $см^3$ (В.5.8). Доводят до метки раствором муравьиной кислоты (В.4.4). Обрабатывают ультразвуком до полного растворения в течение не менее 10 мин.

Рабочий раствор меламина II можно хранить до 10 сут при температуре 4 °С. Готовят свежий рабочий раствор II каждые 10 дней.

В.4.8 Меченый меламин [$^{13}C_3N_3(^{15}NH_2)_3$], изотопная чистота: $^{13}C_3 = 99$ %; амино-$^{15}N_3 = 98$ %; химическая чистота ≥ 98 % по массе, 100 мкг/$см^3$ в воде – 1,2 $см^3$.

В.4.8.1 Исходный стандартный раствор меченого меламина, соответствующий массовой концентрации 100 мкг меченого меламина на кубический сантиметр. .

Исходный раствор изотопа имеется в продаже. Хранят исходный стандартный раствор при комнатной температуре в защищенном от света месте.

В.4.8.2 Рабочий раствор меченого меламина, соответствующий концентрации 10 мкг меченого меламина на кубический сантиметр.

Пипеткой приливают 1 $см^3$ исходного стандартного раствора меченого меламина (В.4.8.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 10 $см^3$ (В.5.8). Доводят до метки раствором муравьиной кислоты (В.4.4).

Рабочий раствор меченого меламина используется в качестве внутреннего стандарта (IS). Хранят раствор при температуре 4°С.

В.5 Аппаратура

Стеклянная посуда (например, мерные колбы, В.5.8) используемая для приготовления стандартных исходных и рабочих растворов, может загрязниться, особенно меламином. Поэтому всю стеклянную посуду следует мыть лабораторным детергентом, споласкивать дистиллированной водой

---

1) Лаборатории изотопов при Кембридже являются примером подходящего поставщика. Эта информация приведена только для удобства пользователей данного документа и не свидетельствует о предпочтении в отношении данного реактива. Можно использовать аналогичные продукты, при условии получения равноценных результатов.

и затем сушить на воздухе.

Используют обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

B.5.1 Центрифужные пробирки, конические, из полипропилена, вместимостью 50 $см^3$, например, 21008-169[1)].

B.5.2 Центрифуга, оснащенная ротором, приспособленная под пробирки вместимостью 50 $см^3$, с ускорением 4 000*g*, например, RC6[2)].

B.5.3 Колонка HPLC, ZIC-HILIC [3)], 2,1 мм × 150 мм, 5 мкм, 20 нм.

B.5.4 Пластиковые шприцы, вместимостью 3 $см^3$, Norm-Ject[1)].

B.5.5 Шприцевые фильтры, Acrodisc 13 мм, мембрана из нейлона 0,2 мкм, например, 28143-985[1)].

B.5.6 Насос HPLC Surveyor MS[4)] соединенный с линейным масс-спектрометром LTQ-XL[4)] с ионной ловушкой, оснащенный источником ионизации электрораспылением.

B.5.7 Аналитические весы, обеспечивающие считывания с точностью до 0,1 мг.

B.5.8 Мерные колбы с одной меткой вместимостью 10, 100, 200 и 1000 $см^3$, ISO 1042[6], класс A.

B.6 Приготовление реактивов

B.6.1 Градуировочная кривая для меламина и циануровой кислоты

B.6.1.1 Стандартные растворы для меламина (от 0 до 5 мг/$дм^3$) с соответствующим внутренним стандартом меламина IS (при концентрации 100 мг/$дм^3$)

Готовят стандартные растворы меламина в шести отдельных мерных колбах с одной меткой вместимостью 10 $см^3$ (B.5.8) в соответствии с таблицей B.1. Хранят стандартные растворы меламина при температуре 4 °C.

---

1) 21008-169, Norm-Ject (53548-014) и 281343-985 – это торговые наименования продукции, поставляемой VWR. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о предпочтении в отношении данного продукта. Можно использовать аналогичные продукты, при условии получения равноценных результатов.

2) RC6 – это торговое наименование продукции, поставляемой Sorvall. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о предпочтении в отношении данного продукта. Можно использовать аналогичные продукты, при условии получения равноценных результатов.

3) ZIC-HILIC – это торговое наименование продукции, поставляемой Merck и имеющейся в Nest Group, article Q150454. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о предпочтении в отношении данного продукта. Можно использовать аналогичные продукты, при условии получения равноценных результатов.

4) Surveyor MS иLTQ-XL – это торговые наименования продукции, поставляемой ThermoElectron. Эта информация приведена только для удобства пользователей настоящего стандарта и не свидетельствует о предпочтении в отношении данного продукта. Можно использовать аналогичные продукты, при условии получения равноценных результатов.

Таблица А.9 — Стандартные растворы меламина

Наименование показателя	Стандартный раствор					
	1	2	3	4	5	6
Рабочий раствор меламина I (В.4.7.2), мкл	0	0	100	200	450	700
Рабочий раствор меламина II (В.4.7.3), мкл	0	150	0	0	0	0
Рабочий раствор меченого меламина (IS) (В.4.8.2), мкл	150	150	150	150	150	150
Ацетонитрил (В.4.2), мкл	9850	9700	9750	9650	9400	9150
Это соответствует:						
концентрации меламина, нг/см^3	0	15	100	200	450	700
концентрации меченого меламина (IS), нг/см^3	150	150	150	150	150	150
содержанию меламина (эквивалентно пробе), мг/кг	0,00	0,10	0,66	1,33	3,00	4,66
содержанию меламина IS (эквивалентно пробе), мг/кг	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

В.6.1.2 Стандартные растворы для циануровой кислоты (от 0 до 5 мг/дм^3) с соответствующим внутренним стандартом циануровой кислоты (IS) (при концентрации 0,66 мг/дм^3)

Готовят смешанные стандартные растворы циануровой кислоты в шести отдельных мерных колбах с одной меткой вместимостью 10 см^3 (В.5.8) в соответствии с таблицей В.2. Хранят стандартные растворы циануровой кислоты при температуре 4 °С.

Таблица А.10 — Стандартные растворы циануровой кислоты

Наименование показателя	Стандартный раствор					
	1	2	3	4	5	6
Рабочий раствор циануровой кислоты (Б.4.5.2), мкл	0	25	100	200	550	700
Рабочий раствор меченой циануровой кислоты IS (Б.4.6.2), мкл	100	100	100	100	100	100
Ацетонитрил (Б.4.2), мкл	9900	9875	9800	9700	9350	9200
Это соответствует:						
концентрации циануровой кислоты, нг/см^3	0	25	100	200	550	700
концентрации циануровой кислоты IS, нг/см^3	100	100	100	100	100	100
содержанию циануровой кислоты (эквивалентно пробе), мг/кг	0,00	0,17	0,66	1,33	3,66	4,66
содержанию циануровой кислоты IS (эквивалентно пробе), мг/кг	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66

В.6.2 Растворы для жидкостной хроматографии

В.6.2.1 Подвижная фаза А, водный раствор ацетата аммония, 10 ммоль/дм^3 в 1+1 смеси ацетонитрила с водой.

Переносят 0,77 г ацетата аммония в мерную колбу с одной меткой вместимостью 1000 см^3 (В.5.8). Добавляют 500 см^3 воды (В.4.1) и растворяют ацетат аммония. Доводят до метки ацетонитрилом (В.4.2) и перемешивают. Фильтруют раствор через фильтр пористостью 0,2 мкм (В.5.5).

В.6.2.2 Подвижная фаза В, ацетонитрил.

Используют ацетонитрил (В.4.2).

В. 7 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в данном приложении. Рекомендуемый метод отбора проб – по ISO 707/IDF 50[2].

Важно, чтобы в лаборатории была получена действительно репрезентативная проба, которая не претерпела повреждений и изменений в процессе транспортирования и хранения.

Сырое молоко хранят при температуре 4 С или в замороженном состоянии, если анализ не будет проводиться непосредственно по получении.

В.8 Подготовка проб для анализа

В.8.1 Сухая молочная смесь для детей раннего возраста

Готовят гомогенную лабораторную пробу путем переноса ее в емкость для пробы вместимостью, в два раза превышающей объем лабораторной пробы. Немедленно закрывают емкость. Тщательно перемешивают, многократно встряхивая и переворачивая емкость

B.8.2 Коровье молоко

Доводят пробу до комнатной температуры. Перед тем, как взять навеску для анализа, убеждаются, что проба гомогенная осторожным перевертыванием емкости несколько раз.

B.9 Проведение

B.9.1 Методика экстракции

Взвешивают с точностью до 0,01 г 3,00 г молочной смеси для детей раннего возраста (B.8.1) или коровьего молока (B.8.2) в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$ (B.5.1). Добавляют 300 мкл рабочего раствора меченого меламина (IS) (B.4.8.2). Добавляют 200 мкл рабочего раствора меченой циануровой кислоты (IS) (B.4.6.2). Затем добавляют 19,5 $см^3$ ацетонитрила (B.4.2) и энергично встряхивают, пока не убедятся в отсутствии сгустков.

Анализируемый раствор обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин, затем перемешивают в течение 5 мин. Центрифугируют раствор для анализа при 4000 g при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирают примерно 2 $см^3$ надосадочной жидкости пластиковым шприцем и фильтруют через шприцевой фильтр (B.5.5) в пробирку для анализа HPLC.

B.9.2 Анализ LC-MS/MS

Вводят раствор в хроматограф/масс-спектрометр (LC/MS) для анализа.

Примечание – Меламин и циануровую кислоту обнаруживают по отдельности в разных прогонах на LC/MS.

B.9.2.1 Условия HPLC

Подвижная фаза A: раствор ацетата аммония (B.6.2.1);
подвижная фаза B: ацетонитрил (B.6.2.2);
вводимый объем: 10 мкл;
колонка: ZIC-HILIC, 2,1 × 150 мм, 5 мкм, 20 нм;
температура: комнатная температура;
скорость потока: 0,4 $см^3$/мин;
градиент: См. таблицу B.3;
отводной клапан: поток HPLC направляется на детектор масс-спектрометра в течение 4 – 9 мин.

Таблица A.11 – Градиент LC, используемый при анализе меламина или циануровой кислоты

Время, мин	A, %	B, %
0	3	97
2	3	97
2,5	20	80
11	20	80
11,5	3	97
16	3	97

Условия HPLC для анализа меламина и циануровой кислоты идентичны. В таких условиях время удерживания как для меламина, так и для циануровой кислоты составляет ~ 5 мин.

B.9.2.2 Параметры MS

Настройка на анализируемое вещество выполняется посредством впрыскивания шприцем по отдельности стандартного раствора меламина и стандартного раствора циануровой кислоты в концентрации 10 мкг/$см^3$. Скорость впрыскивания шприцем поддерживают постоянной на уровне 5 мкл/мин, используя тройник при скорости потока HPLC, равной 0,4 мл/мин. Поток HPLC выдерживают в соотношении 20 % A и 80 % B. Условия работы прибора для анализа меламина и циануровой кислоты приведены в таблицах B.4 — B.6.

Таблица A.12 – Типичные параметры MS для меламина

Параметры	Линейная ионная ловушка LTQ-XL
Тип ионизации	Электрораспыление (ESI)
Напряжение электрораспыления	5 кВ
Полярность	Положительные ионы
Температура передаточной трубки	350 °C
Газ	Защитный газ: 60 условных единиц.; вспомогательный газ: 20 условных единиц.; продувочный газ: 0
Ток распыления	5,6 мкА
Напряжение капилляра	20 В
Максимальное время ввода	100 мс

Таблица А.13 – Типичные параметры MS для циануровой кислоты

Параметры	Линейная ионная ловушка LTQ-XL
Тип ионизации	Электрораспыление(ESI)
Напряжение электрораспыления	4 кВ
Полярность	Отрицательные ионы
Температура передаточной трубки	400 °C
Газ	Защитный газ: 60 условных единиц; вспомогательный газ: 20 условных единиц.; продувочный газ: 0
Ток распыления	4,3 мкА
Напряжение капилляра	14 В
Максимальное время ввода	100 мс

Таблица А.14 – Реакции перехода, наблюдаемые в ионной ловушке в процессе анализа меламина, циануровой кислоты и их соответствующих внутренних стандартов

Аналит	Реакции перехода (m/z) [a]
Меламин	127,1 → 85,1 (24)
Меченый меламин [$^{13}C_3N_3(^{15}NH_2)_3$] (IS)	133,1 → 89,1 (24)
Циануровая кислота	128,0 → 85,0 (24)
Меченая циануровая кислота ($^{13}C_3H_3{}^{15}N_3O_3$) (IS)	134,0 → 88,9 (24)
[a] Энергии столкновений (в электрон-вольтах) приведены в скобках.	

В.10 Расчет и обработка результатов

В.10.1 Расчеты

Примечание – Градуировочная кривая типа

$$\alpha = bw + a ,$$

где α – соотношение площадей;

b – наклон;

w – массовая доля;

a – отсекаемый отрезок.

Рассчитывают содержание аналита, w_a, в миллиграммах на килограмм (если определяют меламин, $w_a = w_m$; если определяют циануровую кислоту, $w_a = w_c$), с использованием следующего уравнения:

$$w_a = \frac{\alpha - a}{b} \times \frac{20}{m \times 1000} ,$$

где a – отсекаемый отрезок линии регрессии;

b – наклон линии регрессии;

m – масса, в граммах, анализируемой пробы (В.9.1).

В.10.2 Обработка результатов

Результаты для аналита(ов) выражают с точностью до двух знаков после запятой.

В.11 Рабочие характеристики

В.11.1 Линейность

Градуировочная кривая для меламина линейна в диапазоне концентраций от 0 до 5 мг/кг (эквивалент содержания в пробе). Для циануровой кислоты кривая линейна на участке от 0 до 7 мг/кг (эквивалент содержания в пробе).

В.11.2 Выход аналита

В 16 проб молочной смеси для детей раннего возраста добавили меламин и циануровую

кислоту в количестве, кратном 0,1; 0,5; 1,0 и 1,5 от максимального уровня (ML).

Средний выход меламина составил 99 %, а циануровой кислоты – 105 %.

B.11.3 Пределы обнаружения

LoD (отношение сигнал-шум составляет 3) для определения содержания меламина равны 0,08 мг/кг в молочных смесях для детей раннего возраста и 0,07 мг/кг в коровьем молоке, соответственно.

LoD для определения содержания циануровой кислоты равны 0,10 мг/кг в молочных смесях для детей раннего возраста и 0,07 мг/кг в коровьем молоке соответственно.

B.11.4 Пределы количественного анализа

LoQ (самый низкий достоверный уровень) для определения содержания меламина равны 0,11 мг/кг в молочных смесях для детей раннего возраста и 0,10 мг/кг в коровьем молоке соответственно.

LoQ для определения содержания циануровой кислоты равны 0,13 мг/кг в молочных смесях для детей раннего возраста и 0,10 мг/кг в коровьем молоке соответственно.

B.11.5 Пределы принятия решения и возможности детектирования в молочной смеси для детей раннего возраста для меламина и циануровой кислоты

Учитывая, что максимальный предел (ML) составляет 1 мг/кг в молочной смеси, пределы принятия решения w_{CC_α} и возможности детектирования w_{CC_β} были рассчитаны после повышения концентрации 20 проб молочной смеси при ML, равном 1 мг/кг; результаты приведены в a) и b).

g) Для меламина: w_{CC_α} = 1,06 мг/кг; w_{CC_β} = 1,16 мг/кг;

h) Для циануровой кислоты: w_{CC_α} = 1,11 мг/кг; w_{CC_β} = 1,19 мг/кг.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Эти значения получены в условиях повторяемости и должны быть проверены в условиях воспроизводимости, прежде чем пользоваться ими.

B.11.6 Прецизионность

B.11.6.1 Повторяемость

Типичные значения повторяемости, полученные одним и тем же оператором в одной и той же лаборатории с помощью данного метода, следующие:

i) для меламина: 8 % в интервале содержания от 0,5 до 1,5 мг/кг;

j) для циануровой кислоты: 9 % в интервале содержания от 0,5 до 1,5 мг/кг.

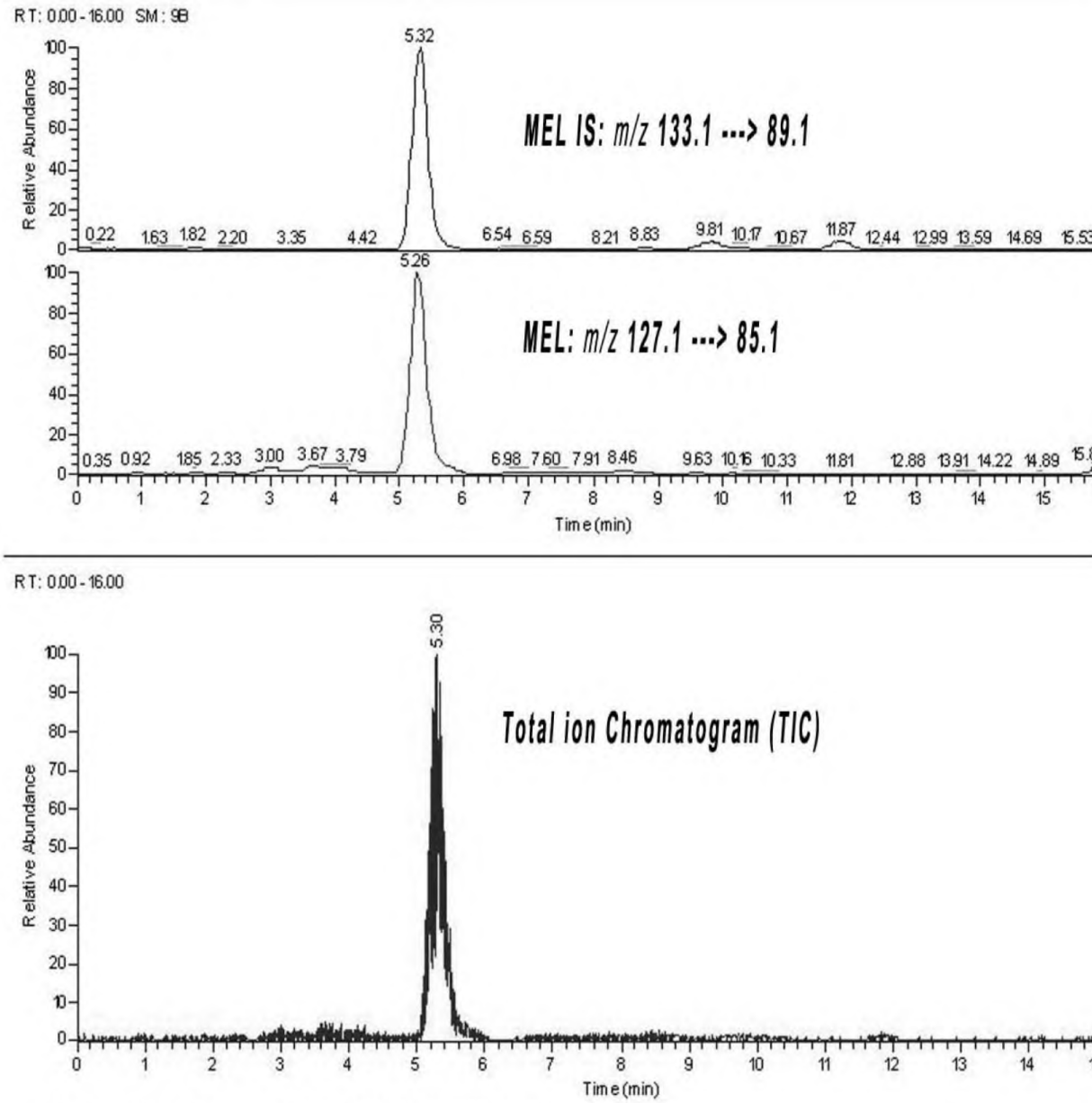
Примечание – Эти значения были рассчитаны как коэффициент вариации и повторяемости C_{Vr} для серии анализов. Три серии анализов были выполнены при концентрациях 0,5, 1,0 и 1,5 мг/кг. В этих трех случаях C_{Vr} для каждой серии составило 8 % для меламина и 9 % для циануровой кислоты.

B.11.6.2 Воспроизводимость

Не определялась.

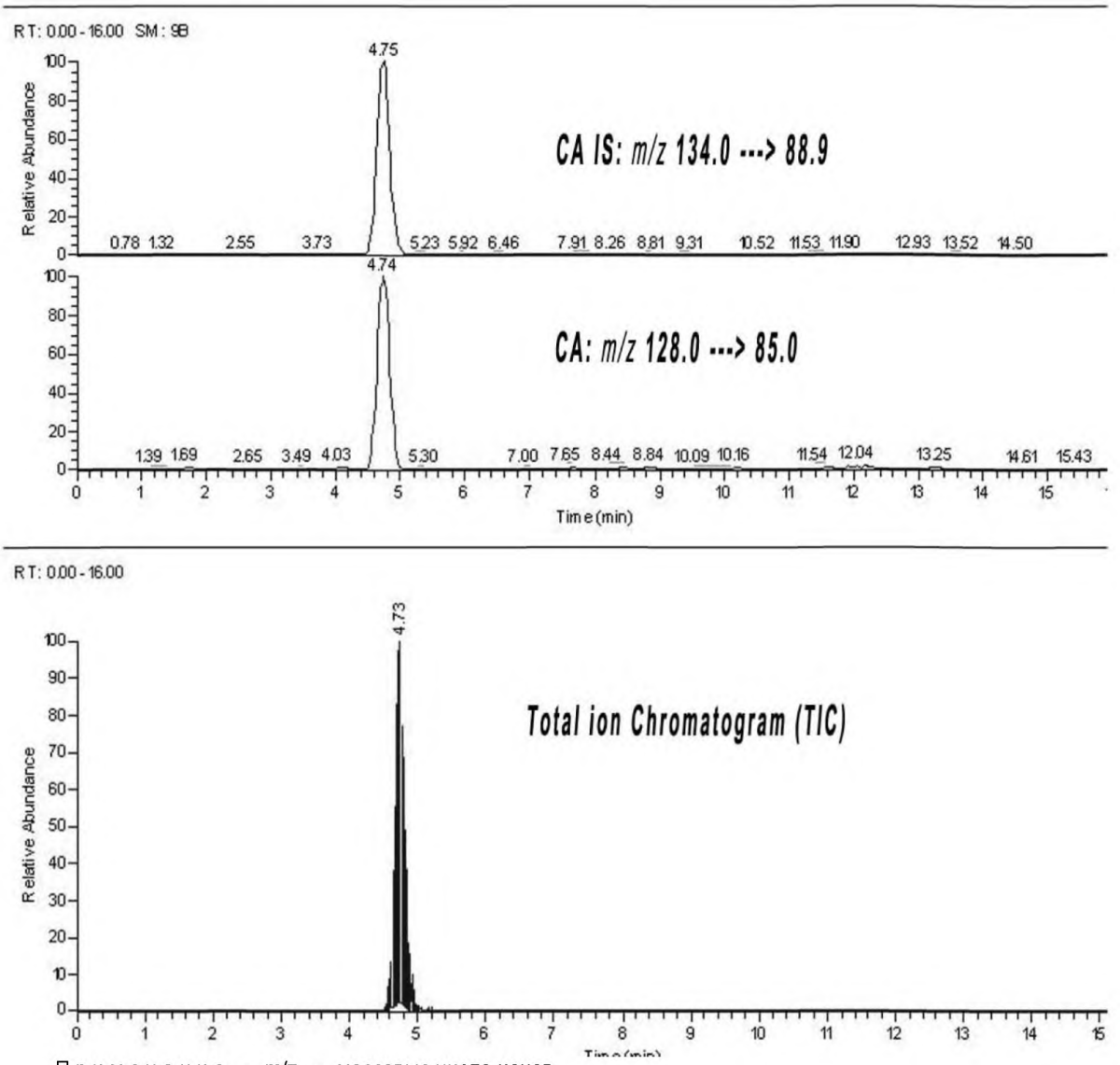
B.12 Результаты анализа проб в рисунках

См. Рисунки B.1 и B.2.



Примечание – m/z – массовые числа ионов.

Рисунок B.1 — Хроматограмма LC-MS/MS меламина (MEL) из экстракта детской молочной смеси NIST при концентрации введенного вещества: MEL = 0,50 мг/кг



Примечание – m/z – массовые числа ионов.

Рисунок В.2 – Хроматограмма LC-MS/MS циануровой кислоты (CA) из экстракта детской молочной смеси NIST при концентрации введенного вещества: CA = 0,50 мг/кг

В.13 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать, как минимум, следующую информацию:

k) все сведения, необходимые для полной идентификации пробы;

l) использованный метод отбора проб, если известен;

m) использованный метод анализа, со ссылкой на данное приложение (ISO/TS 15495/IDF/RM 230:2010, приложение B);

n) все детали операций, не установленные в данном приложении или рассматриваемые как необязательные, наряду с описанием случайностей, которые могли повлиять на результат(ы) анализа;

o) полученные результаты испытания;

p) если проверена повторяемость, то конечный полученный результат.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных межгосударственных стандартов международным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение ссылочного межгосударственного стандарта
ISO 3534 (все части) Статистика. Словарь и обозначения[1)]	–	*
ISO 5725-1 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерения. Часть 1. Общие принципы и определения	–	**
*** Соответствующий межгосударственный стандарт по версии ISO 3534 отсутствует.** ** Соответствующий межгосударственный стандарт по версии ISO 5725-1 отсутствует.		

1) ISO 3534-1:2006, ISO 3534-2:2006, ISO 3534-3:1999.

Библиография

[1] Решение Комиссии ЕС 2002/657/ЕС, 2002 *Official Journal of the European Communities*, L2218-36, 12 August 2002, изменяющее Директиву Совета 96/23/ЕС в отношении выполнения аналитических методов и интерпретации результатов, измененной последний раз Решением Комиссии 2005/34 от 11 января 2005 г.

[2] ISO 707/IDF 50 Milk and products – Guidance on sampling (Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[3] Desmarchelier A., Guillamon Cuadra M., Delatour T., Mottier P. Simultaneous quantitative determination of melamine and cyanuric acid in cow's milk and milk-based infant formula by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, pp. 7186-7193

(Одновременное количественное определение меламина и циануровой кислоты в коровьем молоке и молочных смесях для детей раннего возраста методом жидкостной хроматографии с ионизацией распылением и тандемной масс-спектрометрии)

[4] ISO 835 Laboratory glassware – Graduated pipettes (Посуда лабораторная стеклянная. Мерные градуированные пипетки)

[5] ISO 8655-2 Piston-operated volumetric apparatus -- Part 2: Piston pipettes (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 2. Пипетки, приводимые в действие поршней)

[6] ISO 1042 Laboratory glassware - One-mark volumetric flasks (Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой)

[7] ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)

УДК 576.8:006.354 МКС 67.100.99 IDT

Ключевые слова: молоко, молочные продукты и питание для детей раннего возраста, руководящие указания, меламин, циануровая кислота, количественное определение, жидкостная хроматография с ионизацией электрораспылением, тандемная масс-спектрометрия, термины и определения, принцип, отбор проб, подготовка проб, методика, выражение результатов, протокол испытания

Подписано в печать 05.11.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 3,72. Тираж 58 экз. Зак. 3020.

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