

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВETERИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора, руководитель
испытательного центра
ФГБУ «ВГНКИ»



М.А. Гергель М.А. Гергель

«25» декабря 2020 г.

**Методические указания по определению остаточного содержания
пепфлоксацина в продукции животноводства методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии с
масс-спектрометрическим детектированием
МУ А-1/077**

Москва
2020

ФГБУ «ВГНКИ»

Учтенная копия № 911

Дата «18» декабря 2023 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», 123022, г. Москва, Звенигородское ш., 5, Телефон/факс: (499) 253-14-68/ (499)256-22-50; E-mail: kanc@vgnki.ru

Отдел безопасности пищевых продуктов (А.В. Третьяков, А.В. Сорокин, И.В. Батов, С.В. Белов, Е.А. Мамедова, О.Е. Латышев, А.Е. Жедулов, Е.А. Небера, Т.С. Грачева, Т.М. Сухова, С.А. Грачев, Д.Ю. Некрасов, А.Ю. Ефимов, Н.С. Бардюгов).

Методические указания аттестованы ФГБУ «ВГНКИ».

Свидетельство об аттестации № 310354-0067/202 от 25.12.2020г

Регистрационный номер методик измерений по Федеральному реестру

ФР.1.31.2021.3954

Содержание

1 Назначение и область применения	4
2 Нормативные ссылки	4
3 Требования к показателям точности измерений	6
4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам	7
5 Метод измерений	9
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	10
7 Требования к квалификации операторов	10
8 Требования к условиям измерений	10
9 Отбор и хранение проб	11
10 Подготовка к выполнению измерений	11
11 Порядок выполнения измерений	18
12 Обработка результатов измерений	18
13 Оформление результатов измерений	18
14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории	19
Приложение А	20

1 Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений остаточного содержания пefлоксацина в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и предназначен для организаций и учреждений, независимо от их организационно-правовой формы, осуществляющих контроль безопасности продукции животноводства, а также мониторинг продукции животноводства по остаточному содержанию лекарственных средств.

Методика измерений входит в состав Методических указаний по определению содержания пefлоксацина в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Диапазон измерений массовой доли пefлоксацина в продукции животноводства от 1 до 2000 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящей методике измерений использованы ссылки на следующие документы в области стандартизации:

ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

ГОСТ Р ИСО 21748-2012. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений.

ГОСТ 12.0.004-2015 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения.

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

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

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

ГОСТ 12.1.009-2017 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Термины и определения.

ГОСТ 12.3.002-2014 Система стандартов безопасности труда. Процессы производственные. Общие требования безопасности.

ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация.

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

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроксид. Технические условия.

ГОСТ 4814-57 Блоки мясные замороженные. Технические условия.

ГОСТ 5848-73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия.

ГОСТ 5962-2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья.

Технические условия

ГОСТ 6995-77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия.

ГОСТ 7269-2015 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести.

ГОСТ 19792-2017 Мед натуральный. Технические условия.

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

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

ГОСТ 29169-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой.

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

ГОСТ 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.

ГОСТ 31720-2012 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа.

ГОСТ 31654-2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ГОСТ 34037-2016 Упаковка стеклянная для химических реактивов и особо чистых химических веществ. Общие технические условия.

Примечание При пользовании настоящим документом на методику измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или ежегодно издаваемому 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 документом на методику измерений 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 Требования к показателям точности¹ измерения

Настоящие методические указания имеют показатели точности и обеспечивают получение результатов измерений массовой доли пefлoксaцинa с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели точности методики (значения относительной расширенной неопределенности результатов измерений, относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости).

Объект	Диапазон измерения массовой доли, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U^* , % при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости r , % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
Мясо, мясная продукция, рыба	От 1 до 100 вкл.	30	8	14	22
	От 100 до 2000 вкл.	19	7	9	19

¹ В соответствии с ГОСТ Р 8.563-2009 (п. 3.4) в качестве показателя точности использованы показатели неопределенности измерений

Субпродукты	От 1 до 100 вкл.	33	10	15	28
	От 100 до 2000 вкл.	20	6	10	17
Мёд	От 1 до 100 вкл.	30	10	14	28
	От 100 до 2000 вкл.	20	8	10	22
Молоко	От 1 до 100 вкл.	30	10	15	28
	От 100 до 2000 вкл.	18	7	10	19
Яйца	От 1 до 100 вкл.	33	10	15	28
	От 100 до 2000 вкл.	18	6	8	17

Значения показателя точности (расширенной неопределенности) методики используют при:

- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке деятельности лабораторий на качество проведения измерений;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики измерений в лаборатории

4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.

4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства

4.1.1 Масс-спектрометр с гибридным квадрупольным анализатором с диапазоном измерений m/z от 5 до 1200 «6500 QTRAP» (AB SCIEX, Канада, США) и компьютером с установленным программным обеспечением Analyst 1.6.2 (AB SCIEX, Канада, США). номер в Государственном реестре средств измерений № 58075-14.

4.1.2 Система высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до $(50 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

4.1.3 Колонка хроматографическая обращённо-фазная длиной 150 мм, с диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм.

4.1.4 Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

4.1.5 Весы специального (I) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом (e) не более 1 мг и действительной ценой деления (d) не более 0,1 мг. (например: весы аналитические Discovery DV214C (Ohaus, Швейцария), номер в госреестре 33646-06).

4.1.6 Весы высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом (e) не более 0,1 г и действительной ценой деления (d) не более 0,01 г (например: EK-300i (A&D Company, Япония), номер в госреестре 25313-06).

4.1.7 Колбы 2-10-1 и цилиндры 1-1000-1 мерные по ГОСТ 1770.

4.1.8 Дозаторы автоматические одноканальные переменной вместимости 2 - 20 мм³, 10 – 100 мм³, 100 – 1000 мм³, 500 – 5000 мм³ по ГОСТ 28311.

4.1.9 Бутыль стеклянная БВ-1000 по ГОСТ 34037.

4.1.10 Пробирки полипропиленовые вместимостью 15 см³ с завинчивающимися крышками.

4.1.11 Виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 см³ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм.

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

4.1.13 Центрифуга лабораторная рефрижераторная со скоростью вращения не менее 4000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 см³.

4.1.14 Баня ультразвуковая с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 дм³.

4.1.15 Микроцентрифуга лабораторная рефрижераторная со скоростью вращения не менее 10000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см³.

4.1.16 Встряхиватель (шейкер) вибрационный для пробирок орбитального типа движения с амплитудой встряхивания 3 мм и диапазоном скоростей от 150 до 2500 об/мин.

4.1.17 Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

4.1.18 Холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 8°С.

4.1.19 Камера лабораторная морозильная с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 20 °С до минус 40 °С.

4.1.20 Фильтры нейлоновые мембранные с размером диаметра пор не более 0,2 мкм.

4.1.21 Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 см³.

4.2 Реактивы, материалы

4.2.1 эфир диэтиловый, квалификация «ч.д.а.»;

4.2.2 натрия хлорид по ГОСТ 4233, квалификация «х.ч.»;

4.2.3 н-гексан, квалификация «х.ч.»;

4.2.4 кислота муравьиная по ГОСТ 5848, квалификация «ч.д.а.»;

4.2.5 вода дистиллированная по ГОСТ 6709;

4.2.6 метанол, квалификация «х.ч.» по ГОСТ 6995;

4.2.7 ацетонитрил, квалификация по ТУ 6-09-06-1092-83 «ч.д.а.»;

4.2.8 аммония гидроксида водный раствор, с массовой долей основного вещества не менее 28%;

4.2.9 пefлоксацин мезилат дигидрат, с массовой долей основного вещества не менее 90%;

4.2.10 пefлоксацин-Д5, с массовой долей основного вещества не менее 90%.

Примечание 2 – допускается применение стандартных образцов веществ с отличными от приведенных выше содержаниями основного вещества (при приготовлении точных концентраций исходных растворов стандартных образцов выполняют пересчет массы навески стандартного образца на чистое вещество по формуле 1).

Примечание 3 – допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками не хуже приведенных выше.

5 Метод измерений

Измерения содержания остаточных количеств лекарственных средств выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Детектирование анализируемых веществ проводят в режиме мониторинга выбранных реакций (*MRM*).

Используя полученные с применением метода внутреннего стандарта градуировочные характеристики, по площади пиков идентифицированных соединений находят их количественное содержание.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

Используемые в работе реактивы содержат вещества, относящиеся к 1 и 2 классам опасности, при работе с ними необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

Помещения, в которых проводят измерения и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

Операции по приготовлению и использованию градуировочных растворов аналитов и их изотопно-меченых аналогов следует проводить в вытяжном шкафу.

В связи с тем, что при работе на масс-спектрометре используются сжатые газы, следует соблюдать правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением ПБ 10-115-96 Госгортехнадзор России, ГОСТ 12.2.085.

При выполнении измерений на масс-спектрометре следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.2.007.0 и инструкцией по эксплуатации прибора.

7 Требования к квалификации операторов

К операциям по подготовке проб и проведению измерений методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием допускают лиц, прошедших соответствующее обучение и освоивших настоящую методику измерений.

8 Требования к условиям измерений

При приготовлении растворов и подготовки проб к измерениям соблюдают следующие внешние условия:

температура воздуха, °С	(20 ± 5),
атмосферное давление, мм рт.ст.	(630 – 800),
относительная влажность воздуха при температуре 25 °С, %	(40 – 80).

Хроматографические измерения проводят в условиях, приводимых в инструкции по эксплуатации прибора.

9 Отбор и хранение проб

Отбор и хранение проб проводят, руководствуясь письмом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 8 августа 2012 года № ФС-ЕН-2/10267 «Об осуществлении отбора проб (образцов) от подконтрольных товаров для проведения лабораторных исследований в испытательных центрах (лабораториях)», а также в соответствии с ГОСТ 7269, ГОСТ 19792, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 31339, ГОСТ 31467, ГОСТ Р 51447, ГОСТ 31720, ГОСТ 31654.

10 Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы.

10.1 Приготовление растворов

10.1.1 Приготовление раствора хлорида натрия концентрацией 1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ (4.1.10) вносят 58,4 г хлорида натрия (результат взвешивания учитывают с точностью до первого десятичного знака), доводят объем до метки дистиллированной водой (4.2.6), перемешивают.

Раствор хранят при комнатной температуре. Срок годности - не более 3 мес.

10.1.2 Приготовление растворов подвижных фаз

Подвижная фаза А

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 995 см³ дистиллированной воды и 5 см³ муравьиной кислоты (4.2.5). Раствор перемешивают.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

Подвижная фаза Б

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см³ мерным цилиндром отмеряют 995 см³ метанола (4.2.7) и 5 см³ муравьиной кислоты. Раствор перемешивают.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

10.1.3 Приготовление рабочих растворов

При приготовлении исходных растворов анализов рассчитывают навеску, эквивалентную 10,0 мг действующего вещества, исходя из массовой доли в реактиве.

10.1.3.1 Приготовление исходных растворов (C₀)

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0 – 12,0 мг стандартного образца, помещают навеску в полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см³. В пробирку весовым методом добавляют метанол, масса которого рассчитывается по формуле (1):

$$m_p = \frac{m \cdot Ma \cdot Pa \cdot \rho}{Mc \cdot 100 \cdot C}, \quad (1)$$

где m_p —масса метанола, г;

m —масса стандартного образца, г;

Ma —молярная масса чистого вещества, г/моль;

Mc —молярная масса соли стандартного образца, г/моль;

Pa — степень чистоты стандартного образца, %;

ρ — плотность метанола, г/см³;

C — концентрация раствора C_0 , г/см³.

Плотность метанола (ρ) определяют в зависимости от температуры воздуха в помещении в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2– Зависимость плотности метанола от температуры воздуха в помещении.

Температура воздуха, °С	Плотность метанола (ρ), г/см ³
15,0	0,7961
15,5	0,7956
16,0	0,7952
16,5	0,7947
17,0	0,7942
17,5	0,7938
18,0	0,7933
18,5	0,7928
19,0	0,7924
19,5	0,7919
20,0	0,7914
20,5	0,7909
21,0	0,7905
21,5	0,7900
22,0	0,7895
22,5	0,7891
23,0	0,7886
23,5	0,7881
24,0	0,7877
24,5	0,7872
25,0	0,7867
25,5	0,7862
26,0	0,7858
26,5	0,7853

27,0	0,7848
27,5	0,7844
28,0	0,7839
28,5	0,7834
29,0	0,7829
29,5	0,7825
30,0	0,7820

Массовая концентрация аналита в растворе C_0 составляет 1 мг/см³.

Срок хранения растворов при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 1 года.

10.1.3.2 Приготовление рабочего раствора (C_1)

С помощью автоматического дозатора (4.1.9) отбирают 0,1 см³ раствора C_0 пefлоксацина переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе C_1 пefлоксацина составляет 10 мкг/см³.

Срок хранения раствора C_1 при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 6 месяцев.

10.1.3.3 Приготовление рабочего раствора (C_2)

С помощью автоматического дозатора отбирают 1,0 см³ раствора C_1 и переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе C_2 пefлоксацина составляет 1 мкг/см³.

10.1.3.4 Приготовление рабочего раствора (C_3)

С помощью автоматического дозатора отбирают 1,0 см³ раствора C_2 и переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе C_3 пefлоксацина составляет 0,1 мкг/см³.

Срок хранения растворов C_2 - C_3 при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 3 месяцев.

10.1.3.5 Приготовление исходных растворов (D_0) внутренних с массовой концентрацией 1 мг/см³

На весах (4.1.6) взвешивают 4,0-6,0 мг внутренних стандартов аналитов и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см³. В пробирки весовым методом добавляют растворитель - метанол, масса которого рассчитывается по формуле (1).

Срок хранения растворов при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – 1 год.

10.1.3.6 Приготовление рабочего раствора (D_1) внутренних стандартов

С помощью автоматического дозатора отбирают 0,1 см³ раствора D_0 пefлоксацина-Д5 и переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация внутреннего стандарта пefлоксацина-Д5 в растворе D₁ составляет 10 мкг/см³.

Срок хранения раствора при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 6 месяцев.

10.1.3.7 Приготовление рабочего раствора (D₂) внутренних стандартов

С помощью автоматического дозатора отбирают 1 см³ раствора D₁ и переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация внутреннего стандарта пefлоксацина-Д5 в растворе D₂ составляет 1 мкг/см³.

Срок хранения раствора – не более 3 месяцев.

10.1.4 Приготовление градуировочных растворов (G₁ – G₅) пefлоксацина

10.1.4.1 Приготовление градуировочного раствора (G₁)

В пластиковый флакон вместимостью 15 см³ помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего пefлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объёма к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.2.7) и 0,01 см³ раствора C₃ (10.1.2.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пefлоксацина в приготовленном образце составляет 1 мкг/кг.

10.1.4.2 Приготовление градуировочного раствора (G₂)

В пластиковый флакон вместимостью 15 см³ помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего пefлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объёма к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ и 0,1 см³ раствора C₃, встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пefлоксацина в приготовленном образце составляет 10 мкг/кг.

10.1.4.3 Приготовление градуировочного раствора (G₃)

В пластиковый флакон вместимостью 15 см³ помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего пefлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объёма к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ и 0,1 см³ раствора C₂, встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пefлоксацина в приготовленном образце составляет 100 мкг/кг.

10.1.4.4 Приготовление градуировочного раствора (G₄)

В пластиковый флакон вместимостью 15 см³ помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего пefлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объёма к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ и 0,05 см³ раствора C₁, встряхивают

на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пefлoксaцинa в пригoтoвленнoм oбразцe сoстaвляeт 500 мкг/кг.

10.1.4.5 Приготовление градуировочного раствора (G₅)

В пластиковый флакон вместимостью 15 см³ помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего пefлoксaцин (блaнк) (для кaждoгo типa мaтриц гoтoвят индивидуальнe гpaдуирoвoчнe рaствoры). С пoмoщью дoзaтoрa пeрeмeннoгo oбъeмa к oбразцy дoбaвляют 0,05 см³ рaствoрa D₂ и 0,2 см³ рaствoрa C₁, встряхивают нa шeйкeрe-вoртeксe 1 минуту. Зaтeм прoвoдят прoцeдурy прoбoпoдгoтoвки сoгласнo рaздeлу 10.4.

Концентрация пefлoксaцинa в пригoтoвленнoм oбразцe сoстaвляeт 2000 мкг/кг.

Для удoбствa внeсeния aликвoт стaндaртнoх рaствoрoв, мoжнo испoльзoвaть инфoрмaцию, укaзaннyю в тaблицe 3. Гoтoвыe гpaдуирoвoчнe рaствoры, прoшeдшиe стaдию прoбoпoдгoтoвки хрaнятся нe бoлee 24 чaсoв при тeмпeрaтурe oт 0 °С дo 5 °С.

Таблица 3 – Приготовление градуировочных растворов.

Название образца	Рабочий раствор C ₁ , см ³	Рабочий раствор C ₂ , см ³	Рабочий раствор C ₃ , см ³	Рабочий раствор D ₂ , мм ³
Бланк	–	–	–	50
G ₁	–	–	0,01	
G ₂	–	–	0,1	
G ₃	–	0,1	–	
G ₄	0,05	–	–	
G ₅	0,2	–	–	

10.2 Подготовка прибора к измерениям

Подготовку масс-спектрометра к работе осуществляют в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора.

10.2.1 Параметры настройки системы высокоэффективной жидкостной хроматографии

температура колонки 40°C;

скорость потока подвижной фазы 0,25 см³/мин;

объем вводимой пробы 0,02 см³.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: с 0,0 по 7,0 минуту градиентное элюирование от 85 % до 10 % фазы А; с 7,0 по 7,1 минуту переход от 10 % до 0 % фазы А, с 7,1 по 8,0 минуту элюирование 0 % фазы А, с 8,0 по 8,2 минуту переход от 0 % до 85 % фазы А, с 8,2 по 15,0 минуту – уравнивание колонки в 85 % фазы А.

10.2.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Таблица 4 – Параметры в режиме MRM в условиях электрораспыления с регистрацией положительных ионов

№	Определяемое вещество	Ион-предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	Время удерживания, мин.	Энергия столкновений, эВ / Потенциал на выходе из ячейки, В
1	Пефлоксацин	334,2	316,2/290,2	4,42	25/18 24/17
2	Пефлоксацин-Д5	339,0	321,1	4,41	29/19

Напряжение на зонде (IS): + 5500 В

Разрешение квадруполей Q1/Q3: единичное;

Поток газа для фрагментации (CAD): 6

Контроль чувствительности масс-спектрометра осуществляют введением 0,02 см³ градуировочного раствора G₁ в инжектор системы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученное значение соотношения сигнал/шум для каждого MRM перехода определяемого вещества должно быть не менее 10.

10.3 Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику строят заново перед каждой новой серией измерений. Для нахождения градуировочной характеристики используют не менее четырех градуировочных растворов.

Процедура приготовления градуировочных растворов описана в разделе 9.1.3. Для приготовления проводят обработку «чистых» проб (бланков) согласно разделу 10.4.

Для определения массовой доли пефлоксацина в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в качестве внутреннего стандарта используют пефлоксацин-Д5.

Градуировочную зависимость строят с помощью программы «Analyst» в координатах «отношение площади пика определяемого вещества к площади пика внутреннего стандарта этого вещества» – «концентрация определяемого вещества в градуировочном растворе». При построении градуировочной зависимости используют линейную регрессию, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

Для нахождения градуировочной характеристики в инжектор системы высокоэффективной жидкостной хроматографии вводят по 0,02 см³ градуировочных растворов. Подвижную фазу, реагенты и матрицу предварительно проверяют на наличие пефлоксацина или других соединений, мешающих определению.

10.4 Подготовка проб

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

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. Пробу измельчают на гомогенизаторе и взвешивают по (1,0 ± 0,05) г гомогенизированной ткани в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см³. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см³ рабочего раствора внутреннего стандарта D₂, помещают её в шейкер для перемешивания в течение 20 мин и выдерживают в темноте при комнатной температуре 10 минут. Приливают 3 см³ ацетонитрила (4.2.8), 250 мм³ водного раствора гидроксида аммония (4.2.9) и

помещают на 10 мин в шейкер для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Переливают надосадочную жидкость в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³. К осадку приливают 750 мм³ дистиллированной воды (4.2.6), 3 см³ ацетонитрила, 250 мм³ водного раствора гидроокиси аммония, повторяют экстракцию на шейкере и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Надосадочные жидкости, полученные при первой и второй экстракциях, объединяют, после чего обезжиривают путем добавления 3 см³ гексана (4.2.4), 3 см³ диэтилового эфира (4.2.2) и 250 мм³ раствора хлорида натрия (10.1.1). Пробирку помещают в шейкер на 10 мин, затем центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин. Удаляют верхний из образовавшихся слоев (гексан) и упаривают остаток до 0,1 см³ в токе азота при 50°С. Полученный остаток переносят в микроцентрифужную пробирку, приливают подвижную фазу А (10.1.2) до 1 см³ и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Дозатором переменного объема переносят центрифугат в виалу для автосамплера системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (4.1.12). Полученный раствор используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

10.4.2 Подготовка проб яичного порошка

Отобранную пробу яичного порошка перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают ($1,0 \pm 0,05$) г в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см³ рабочего раствора внутренних стандартов D₂. Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят 10.4.1.

10.4.3 Подготовка проб яиц и меланжа

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе, меланж тщательно перемешивают. Взвешивают ($1,0 \pm 0,05$) г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см³ рабочего раствора внутренних стандартов D₂. Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

10.4.4 Подготовка проб молока

Отобранную пробу перед анализом тщательно перемешивают.

Взвешивают ($1,0 \pm 0,05$) г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см³. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см³ рабочего раствора внутренних стандартов D₂. Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1. Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245 (пункт 3.4).

10.4.5 Подготовка проб мёда

Отобранную пробу перед анализом тщательно перемешивают.

Взвешивают ($1,0 \pm 0,05$) г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см³, добавляют 5 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см³ рабочего раствора внутренних стандартов D₂. Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

11 Порядок выполнения измерений

При выполнении измерений в инжектор системы высокоэффективной жидкостной хроматографии вводят 0,02 см³ анализируемого раствора. Подвижную фазу и реагенты предварительно проверяют на наличие пefлоксаина или других соединений, мешающих определению. С помощью установленных градуировочных характеристик проводят количественное определение пefлоксаина в анализируемом растворе.

12 Обработка результатов измерений

Результаты измерений обрабатываются с помощью программы Analyst и выдаются в виде массовой доли анализируемого вещества.

12.1 За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (1):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r, \quad (1)$$

где X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли вещества, мкг/кг, r – значение предела повторяемости, % (таблица 2).

12.2 Если условие (1) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данной методикой измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}, \quad (2)$$

где X_{\max}, X_{\min} – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой доли аналита, мкг/кг;

$CR_{0,95}$ – значение критического диапазона для уровня вероятности $P = 0,95$ и n – результатов определений.

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r,$$

для $n = 4$

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r, \quad (3)$$

где σ_r – показатель повторяемости, % (таблица 2).

12.3 Если условие (2) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

13 Оформление результатов измерений

Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$\bar{X}_{k,c} \pm 0,01 \cdot U_{k,c} \cdot \bar{X}_{k,c}, \text{ при } P = 0,95,$$

где $\bar{X}_{k,c}$ – среднее арифметическое значение результатов n определений массовой доли аналита, признанных приемлемыми по 11.1, 11.2, мкг/кг;

$U_{k,c}$ – значение относительной расширенной неопределенности, % (таблица 2).

14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории рекомендуется осуществлять по ГОСТ Р ИСО 5725-6, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 и показателя правильности по 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6. Проверка стабильности может быть осуществлена с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

Приложение А
(информационное)

Библиография

[1] Р 50.2.003-2000 ГСИ «Внутренний оперативный контроль качества. Пакет программ Qcontrol».

[2] РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа