

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

УТВЕРЖДЕНО
Заместитель директора ФГБУ «ВГНКИ»

А.В. Третьяков

«14» 04 2023 г.

на основании доверенности от 08.07.2022 № 35



**Методические указания по определению остаточного
содержания хлорамфеникола в продукции
животноводства методом высокоэффективной
жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим
детектированием
МУ А-1/103**

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) 253-14-91; E-mail: vgnki@fsvps.gov.ru

АТТЕСТОВАНА: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

Номер аттестата аккредитации юридического лица, аттестовавшего методику (метод) измерений: аттестат аккредитации в области обеспечения единства измерений № РОСС.RU.0001.310354

Свидетельство об аттестации № РОСС.RU.0001.310354-0095/2023 от 14.04.2023 г.

Регистрационный номер методики измерений в Федеральном реестре:
ФР.1.31.2023.46309

СОДЕРЖАНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	5
3 ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ.....	8
4 ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНОМУ ОБОРУДОВАНИЮ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ	9
4.1 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ	9
4.2 ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
4.3 РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ	10
5 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ	11
6 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	11
7 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ.....	11
8 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ИЗМЕРЕНИЙ.....	12
9 ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.....	12
10 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ	12
10.1 Подготовка лабораторной посуды.....	12
10.2 Приготовление растворов.....	12
10.3 Подготовка прибора к измерениям	16
10.4 Установление градуировочной характеристики	17
10.5 Подготовка проб	18
11 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ	19
12 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	20
13 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ.....	21
15 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИКИ В ЛАБОРАТОРИИ.....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	23

Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли хлорамфеникола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и предназначен для организаций и учреждений, осуществляющих контроль безопасности пищевой продукции, а также мониторинг продукции животноводства по остаточному содержанию лекарственных средств.

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

Диапазон измерений массовой доли хлорамфеникола в мясе и мясных продуктах, мясе птицы и продуктах из мяса птицы, молоке и молочных продуктах, яйцах, яичном меланже, яичном порошке, мёде, субпродуктах, рыбе, морепродуктах составляет от 0,1 до 100 мкг/кг, в кишках и кишечном сырье от 0,15 до 100 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

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

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

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

ГОСТ Р 12.1.019 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания.

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

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

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

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

ГОСТ 12.2.007.0 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности.

ГОСТ 12.2.085 Арматура трубопроводная. Клапаны предохранительные. Выбор и расчет пропускной способности.

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

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

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ Р 52501-2005 (ИСО 3696:1987). Вода для лабораторного анализа.

ГОСТ 5848 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия.

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия.

ТУ 2636-040-44493179-00 Ацетонитрил (метил цианистый, нитрил уксусной кислоты) для хроматографии х.ч.

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

ГОСТ Р 51447 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб.

ГОСТ 4814 Блоки мясные замороженные. Технические условия.

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

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

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

ГОСТ 29245 Консервы Молочные Методы определения физических и органолептических показателей.

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия.

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

ГОСТ 19792 Мед натуральный. Технические условия.

ГОСТ 33791-2016 Кишки и мочевые пузыри свиные. Технические условия»

ГОСТ 33790-2016 Кишки и мочевые пузыри говяжьи. Технические условия»

ГОСТ 31339 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приёмки и методы отбора проб.

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

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний.

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

Примечание¹

¹ 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 точности измерения

Настоящие методические указания имеют следующие показатели точности (таблица 1) и обеспечивают получение результатов измерений массовой доли хлорамфеникола с неопределенностью, не превышающей значений, приведенных в таблице 1.

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

Объект исследования	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности * $\pm U$, % при коэффициенте охвата $k = 2$, %	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости), σ_r , %	Предел повторяемости, r , % (при $P = 0,95$, $n = 2$)	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R , %
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, молоко и молочные продукты, яйца, яичный меланж, яичный порошок	от 0,1 до 0,5 вкл.	26	6	18	13
	св. 0,5 до 1,0 вкл.	22	5	15	11
	св. 1,0 до 100 вкл.	20	4	10	9
Мёд, субпродукты, рыба, морепродукты	от 0,1 до 0,5 вкл.	32	7	20	16
	св. 0,5 до 1,0 вкл.	24	6	18	11
	св. 1,0 до 100 вкл.	20	6	17	9
Кишки и кишечное сырье	от 0,15 до 0,5 вкл.	20	6	17	8
	св. 0,5 до 1,0 вкл.	18	6	16	8
	св. 1,0 до 100 вкл.	12	6	16	5

*-Соответствует относительному значению точности при доверительной вероятности $P=0,95$

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, вспомогательному оборудованию, материалам, реактивам

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы.

4.1 Средства измерений

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

4.1.2 Система высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до (40 ± 10) °С.

4.1.3 Колонка хроматографическая, обращено-фазная C18, длиной 150 мм с диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм (например, Agilent Pursuit 5).

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: ЕК-300i (A&D Compaу, Япония), номер в госреестре 25313-06).

4.1.7 Колбы мерные 2–10–2 по ГОСТ 1770.

4.1.8 Дозаторы механические автоматические переменной вместимости $(2 - 20)$ мм³, $(10 - 100)$ мм³, $(100 - 1000)$ мм³, $(500 - 5000)$ мм³ по ГОСТ 28311.

4.1.9 Цилиндры мерные 1–100(500,1000)–1 по ГОСТ 1770.

4.2 Вспомогательное оборудование

4.2.1 Пробирки полипропиленовые вместимостью 15 см³ с завинчивающимися крышками.

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

4.2.3 Модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей.

4.2.4 Центрифуга лабораторная рефрижераторная, совместимая с пластиковыми пробирками объемом 15 см³.

4.2.5 Баня ультразвуковая.

4.2.7 Картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 см³, заполненные сорбентом на основе сополимера дивинилбензола и винилпирролидона, с частицами диаметром не более 50 мкм, массой 0,06 г (например, Oasis HLB).

4.2.8 Встряхиватель (шейкер) переворачивающий или вибрационный, совместимый с пластиковыми пробирками объемом 15 см³.

4.2.9 Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

4.2.10 Холодильник с рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С.

4.2.11 Камера морозильная с рабочей температурой не выше минус 15 °С.

4.2.12 Фильтры нейлоновые мембранные с размером диаметра пор не более 0,45 мкм.

4.2.13 Устройство для твердофазной экстракции.

4.2.14 Гомогенизатор лабораторный.

4.2.15 Шприцы двухкомпонентные, 2 см³, медицинские.

4.2.16 Шейкер-вортекс (например, Heidolph Reax Control).

4.3 Реактивы и материалы

4.3.1 Калий двуххромовокислый, квалификация «х.ч».

4.3.2 Кислота серная «х.ч.».

4.3.3 Ацетонитрил, квалификация «х.ч».

4.3.4 Муравьиная кислота, квалификация «х.ч.».

4.3.5 Метанол, квалификация «х.ч.».

4.3.6 Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144 или ФС.2.2.0020.18.

4.3.7 Вода деионизированная.

4.3.8 хлорамфеникол, доля основного вещества не менее 90%, CAS № 56-75-7.

4.3.9 хлорамфеникол-D5, доля основного вещества не менее 90%, CAS № 202480-68-0.

Примечание 1 – 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 2 – допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками не хуже приведенных выше.

5 Метод измерений

Измерение массовой доли хлорамфеникола выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Экстракт, содержащий хлорамфеникол, подвергают очистке методом твердофазной экстракции. Детектирование хлорамфеникола проводят в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM) в отрицательной полярности. Используя полученные с применением метода внутреннего стандарта градуировочные характеристики, по площади пиков идентифицированных соединений находят их количественное содержание.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

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

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

В связи с тем, что при работе на масс-спектрометре используют сжатые газы, следует соблюдать «Правила промышленной безопасности опасных производственных объектов, на которых используется оборудование, работающее под избыточным давлением» утвержденные приказом Федеральной службы по экологическому, технологическому и атомному надзору от 25.03.2014 №116, ГОСТ 12.2.085. При выполнении измерений на хромато-масс-спектрометре соблюдают 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 хромато-масс-спектрометрии допускают лиц, прошедших соответствующее обучение и освоивших настоящую методику измерений.

8 Требования к условиям измерений

При приготовлении растворов, подготовке проб и измерениях соблюдают следующие внешние условия:

температура воздуха	(20 ± 5) °С,
атмосферное давление	от 630 до 800 мм. рт. ст.,
относительная влажность воздуха при 25 °С	от 20 % до 85 %.

Выполнение измерений проводят в условиях, рекомендуемых в руководстве по эксплуатации к средствам измерений.

9 Отбор и хранение проб

Отбор и хранение проб проводят в соответствии с ГОСТ Р 51447, ГОСТ 7269, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 26809.2, ГОСТ 31467, ГОСТ 31720, ГОСТ 31339, ГОСТ 19792, ГОСТ 33790, ГОСТ 33791 и [1].

10 Подготовка к выполнению измерений

Подготовка к выполнению измерений включает в себя подготовку лабораторной посуды, приготовление растворов, подготовку хроматографической колонки, подготовку прибора, установление градуировочной характеристики и подготовку пробы.

10.1 Подготовка лабораторной посуды

Лабораторную посуду замачивают на 4 часа в 3 %-ном растворе калия двуххромовокислого. Далее промывают посуду в проточной водопроводной воде с последующим многократным ополаскиванием дистиллированной водой. После высушивания в сушильном шкафу посуду хранят в сухом месте при комнатной температуре.

10.2 Приготовление растворов

10.2.1 3 %-ный раствор калия двуххромовокислого

Навеску (30,0±0,1) г калия двуххромовокислого переносят в фарфоровый стакан вместимостью 1,5 дм³, добавляют с помощью мерного цилиндра 100 см³ дистиллированной воды и растворяют навеску при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Затем осторожно, при постоянном перемешивании стеклянной палочкой, приливают к раствору калия двуххромовокислого с помощью мерного цилиндра 1 дм³ концентрированной серной кислоты.

После остывания приготовленный раствор осторожно переливают в толстостенную бутылку с завинчивающейся крышкой. Раствор пригоден к работе до появления зеленой окраски.

10.2.2 Приготовление подвижных фаз А и Б

Приготовление подвижной фазы А

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см³ мерным цилиндром отмеряют 995 см³ деионизированной воды (4.3.7) и добавляют 5,0 см³ муравьиной кислоты, перемешивают. Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5-10 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

Приготовление подвижной фазы Б

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см³ мерным цилиндром отмеряют 995 см³ метанола и добавляют 5,0 см³ муравьиной кислоты, перемешивают. Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 3 месяца.

10.2.3 Приготовление растворов стандартных образцов

При взвешивании стандартных образцов следует рассчитывать массу навески в пересчете на чистое вещество, согласно формуле 1:

$$m_c = M_c * m * \frac{100}{M * P_a} \quad (1)$$

m_c – масса навески используемого стандартного образца, г;

M_c – молярная масса используемого стандартного образца, г/моль;

m – масса навески чистого стандартного образца, г;

M – молярная масса чистого стандартного образца, г/моль;

P_a – степень чистоты используемого стандартного образца.

10.2.3.1 Приготовление исходного раствора стандартного образца (С0) хлорамфеникола с массовой концентрацией 1000 мкг/см³.

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0 – 12,0 мг стандарта хлорамфеникола, переносят в полипропиленовую 15 см³ пробирку с винтовой крышкой и добавляют метанол из расчета 1 см³ раствора на 1 мг стандарта.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус 20°С в течение 1 года.

10.2.3.2 Приготовление раствора (C_1) с массовой концентрацией аналита в растворе 10 мкг/см^3

Дозатором переменного объема отбирают $0,1 \text{ см}^3$ раствора C_0 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 , доводят до метки метанолом, перемешивают.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус $20 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см^3 пробирку с винтовой крышкой.

10.2.3.3 Приготовление раствора (C_2) с массовой концентрацией аналита в растворе 1 мкг/см^3

Дозатором переменного объема отбирают $1,0 \text{ см}^3$ раствора C_1 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 , доводят до метки метанолом, перемешивают.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус $20 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см^3 пробирку с винтовой крышкой.

10.2.3.4 Приготовление раствора (C_3) с массовой концентрацией аналита в растворе $0,1 \text{ мкг/см}^3$

Дозатором переменного объема отбирают $1,0 \text{ см}^3$ раствора C_2 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 , доводят до метки метанолом, перемешивают.

Приготовленный раствор используют свежеприготовленным.

10.2.3.5 Приготовление раствора (C_4) с массовой концентрацией аналита в растворе $0,01 \text{ мкг/см}^3$

Дозатором переменного объема отбирают $1,0 \text{ см}^3$ раствора C_3 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 , доводят до метки метанолом, перемешивают.

Приготовленный раствор используют свежеприготовленным.

10.2.3.6 Приготовление исходного раствора (D_0) внутреннего стандарта с массовой концентрацией аналита в растворе 1000 мкг/см^3 .

На весах (4.1.5) взвешивают $8,0 - 12,0 \text{ мг}$ внутреннего стандарта хлорамфеникола D_5 , и переносят в полипропиленовую 15 см^3 пробирку с винтовой крышкой добавляют метанол из расчета 1 см^3 раствора на 1 мг внутреннего стандарта.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус $20 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 года.

10.2.3.7 Приготовление раствора внутренних стандартов (D_1) с массовой концентрацией аналита в растворе 10 мкг/см^3

Дозатором переменного объема отбирают $0,1 \text{ см}^3$ раствора D_0 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 , доводят до метки метанолом, перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус $20 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см^3 пробирку с винтовой крышкой.

10.2.3.8 Приготовление раствора внутреннего стандарта (D_2) с массовой концентрацией аналита в растворе 1 мкг/см^3

Дозатором переменного объема отбирают $1,0 \text{ см}^3$ раствора D_1 в мерную колбу вместимостью 10 см^3 , доводят до метки метанолом, перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус $20 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см^3 пробирку с винтовой крышкой.

10.2.4 Приготовление градуировочных растворов стандартных образцов

10.2.4.1 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита $0,1 \text{ мкг/кг}$ ($G1$)

В пластиковую пробирку вместимостью 15 см^3 помещают $1,0 \text{ г}$ образца, не содержащего хлорамфеникол (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,05 \text{ см}^3$ раствора D_2 (10.2.3.8) и $0,01 \text{ см}^3$ раствора S_4 (10.2.3.5), встряхивают на шейкере-вортексе. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5

10.2.4.2 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита $0,15 \text{ мкг/кг}$ ($G2$)

В пластиковую пробирку вместимостью 15 см^3 помещают $1,0 \text{ г}$ образца, не содержащего хлорамфеникол (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,05 \text{ см}^3$ раствора D_2 и $0,015 \text{ см}^3$ раствора S_4 , встряхивают на шейкере-вортексе. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

10.2.4.3 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита $0,5 \text{ мкг/кг}$ ($G3$)

В пластиковую пробирку вместимостью 15 см^3 помещают $1,0 \text{ г}$ образца, не содержащего хлорамфеникол (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,05 \text{ см}^3$ раствора D_2 и $0,05 \text{ см}^3$ раствора S_4 , встряхивают на шейкере-вортексе. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

10.2.4.4 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 1 мкг/кг ($G4$)

В пластиковую пробирку вместимостью 15 см^3 помещают $1,0 \text{ г}$ образца, не содержащего хлорамфеникол (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,05 \text{ см}^3$ раствора D_2 и $0,10 \text{ см}^3$ раствора S_4 , встряхивают на шейкере-вортексе. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

10.2.4.5 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 10 мкг/кг (G5)

В пластиковую пробирку вместимостью 15 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего хлорамфеникол (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ и 0,10 см³ раствора C₃ (10.2.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

10.2.4.6 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 100 мкг/кг (G6)

В пластиковую пробирку вместимостью 15 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего хлорамфеникол (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ и 0,10 см³ раствора C₂ (10.2.3.3), встряхивают на шейкере-вортексе. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

10.3 Подготовка прибора к измерениям

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

10.3.1 Рекомендуемые параметры настройки жидкостного хроматографа

температура колонки 40 °С;

скорость потока подвижной фазы 0,2 см³/мин.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования. Хроматографические условия представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Хроматографические условия

Время, мин.	Поток, см ³ /мин	Фаза А (об.%)	Фаза В (об.%)
0,00	0,2	75,0	25,0
0,50	0,2	75,0	25,0
4,00	0,2	0,0	100,0
6,50	0,2	0,0	100,0
6,60	0,2	75,0	25,0
13,00	0,2	75,0	25,0

Примечание - Допускается использовать иные параметры хроматографии в зависимости от технических особенностей применяемого оборудования, а также используемой колонки.

10.3.2 Рекомендуемые параметры настройки масс-спектрометрического детектора на примере масс-спектрометрического детектора AB Sciex QTRAP 6500.

Таблица 3 - Оптимизированные значения параметров источника ионизации

Температура источника (TEM):	450 °C
Напряжение на капилляре (IS):	-4500 В
Разрешение Q1/Q3:	Unit
Значение вспомогательного газа (CUR):	25
Значение газа источника (GS1):	60
Значение распыляющего газа (GS2):	50
Значение газа ячейки коллизий (CAD):	Medium

Таблица 4 - Параметры в отрицательном режиме MRM в условиях электрораспыления (ESI)

№	Определяемое вещество	Ион-предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	Потенциал декластеризации, В	Энергия столкновений, эВ / Потенциал на выходе из ячейки, В
1	Хлорамфеникол	321,0	152,0*	-60	-29/-10
			194,0	-60	-23/-13
2	Хлорамфеникол–D5	326,0	157,0	-60	-25/-14

* - рекомендуемый ион-продукт для проведения количественного определения

10.4 Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику определяют в каждой новой серии измерений. Для нахождения градуировочной характеристики используют не менее четырех градуировочных растворов.

Процедура приготовления градуировочных растворов описана в разделе 10.2. Для приготовления проводят обработку "чистых" проб (бланков) согласно разделу 10.5, не содержащих действующих веществ, к которым перед обработкой добавляют раствор внутренних стандартов и рабочие растворы анализируемого соединения в необходимом количестве.

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 к концентрации внутреннего стандарта».

При построении градуировочной зависимости используют линейную регрессию, при этом квадрат коэффициента корреляции должен быть не менее 0,98.

Построение градуировочной зависимости во всем диапазоне массовых концентраций проводят не реже одного раза в месяц, а также при использовании новой партии реактивов, замене колонки и после ремонта прибора.

10.5 Подготовка проб

10.5.1.1 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, мяса птицы, продуктов из мяса птицы, субпродуктов, рыбы, морепродуктов, кишок и кишечного сырья.

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани, рыбу – от крупных костей и кожи, креветки – от голов и грубого хитинового покрова. 100 г анализируемой пробы измельчают на гомогенизаторе и взвешивают в полипропиленовой пробирке вместимостью 15,0 см³ 1,0 г образца. Дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутреннего стандарта D₂ (10.2.3.8).

10.5.1.2 Пробирку с пробой выдерживают 20 мин в темном месте. Приливают 4 см³ ацетонитрила и помещают пробирку на 10 мин в шейкер (4.2.8) для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. После центрифугирования верхний органический слой переливают в другую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³, помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе азота (или воздуха) при температуре 40 °С до 0,1 – 0,2 см³. Полученный остаток перерастворяют в 2 см³ дистиллированной воды, перемешивают, помещают на 1 минуту в ультразвуковую баню и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции по 10.5.5.

10.5.2 Подготовка проб яиц, яичного меланжа, яичного порошка.

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают, яичный меланж и яичный порошок тщательно перемешивают. Взвешивают 1,0 г образца в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см³. Последующую подготовку проб проводят по 10.5.1.2

10.5.3 Подготовка проб молока и молочных продуктов.

Молоко, сливки, сметану, кисломолочные напитки и продукты перед анализом тщательно перемешивают.

Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245 (пункт 3.4)

10 г сыра, творога или творожных изделий тщательно растирают.

100 г твёрдого сыра измельчают на гомогенизаторе.

Взвешивают 1,0 г пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15,0 см³. Последующую подготовку проб проводят по 10.5.1.2.

10.5.4 Подготовка проб мёда.

Подготовку проб мёда проводят по ГОСТ 19792 (пункт 7.2), если это необходимо. Взвешивают 2,0 г подготовленной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см³, дозатором вносят 0,05 см³ раствора внутреннего стандарта D₂, добавляют 4 см³ дистиллированной воды. Пробу помещают в шейкер на 10 минут для растворения мёда и используют для твердофазной экстракции по 10.5.5.

10.5.5 Очистка проб методом твердофазной экстракции (ТФЭ).

Картриджи для ТФЭ кондиционируют на вакуумном устройстве для ТФЭ, пропуская последовательно 2 см³ ацетонитрила и 2 см³ дистиллированной воды. Затем через картридж пропускают полученный в соответствии с пп. 10.5.1 - 10.5.4 экстракт (на всех этапах ТФЭ, кроме сушки, вакуум или избыточное давление не применяют). Промывают картридж 2 см³ 20 % раствора метанола, сушат и элюируют аналиты 2 см³ ацетонитрила в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³. Элюат помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе воздуха (или инертного газа) при температуре 40 °С до 0,1 – 0,2 см³. Полученный остаток перерастворяют до 0,75 см³ деионизированной водой, встряхивают и помещают в ультразвуковую баню на 1 минуту. Полученный экстракт фильтруют через мембранный фильтр в виалу и используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

11 Порядок выполнения измерений

При выполнении измерений в инжектор хроматографа вводят анализируемый раствор, полученный в п. 10.5. Подвижную фазу предварительно проверяют на наличие целевых аналитов или других соединений, мешающих определению. С помощью установленных градуировочных характеристик проводят количественное определение аналитов в анализируемом растворе.

12 Обработка результатов измерений

Результаты измерений обрабатываются с помощью программного обеспечения масс-спектрометра (например, Analyst 1.6.2) и выдаются в виде массовой доли анализируемого вещества.

За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений $\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}$, если выполняется условие приемлемости (2):

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

где X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли вещества, мкг/кг,

r – значение предела повторяемости, % (таблица 1).

Если условие (2) 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:

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}, \quad (3)$$

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 $n = 4$

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r, \quad (4)$$

где σ_r – показатель повторяемости, % (таблица 1).

Если условие (3) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

13 Оформление результатов измерений

Результат измерений в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

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

где $\bar{X}_{k,c}$ – среднее арифметическое значение результатов n определений массовой доли хлорамфеникола, для которых выполняется условие (2) или (3), мкг/кг;

U_p – значение относительной расширенной неопределенности, % (таблица 1);

В случае содержания хлорамфеникола в определяемых образцах более верхнего предела количественного определения, вносится запись: «более 100 мкг/кг». В случае, содержания хлорамфеникола в образце менее нижнего предела количественного определения, вносится запись: «менее 0,1 мкг/кг».

14. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности

14.1 Расхождение между результатами измерений, полученными в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности, не должно превышать предела внутрилабораторной прецизионности:

$$\left| X_1 - X_2 \right| \leq 0,01 R_L \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (5)$$

где X_1 и X_2 – результаты измерений массовой доли хлорамфеникола, полученные в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности;

R_L – предел внутрилабораторной прецизионности, выраженный в относительных единицах. Значения предела внутрилабораторной прецизионности приведены в таблице 5.

14.2 При выполнении условия (5) приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднее арифметическое значение.

Таблица 5 - Относительные значения пределов внутрилабораторной прецизионности при доверительной вероятности $P=0,95$

Объект	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), $R_{Л}$, %
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, молоко и молочные продукты, яйца, яичный меланж, яичный порошок	от 0,1 до 0,5 вкл.	36
	св. 0,5 до 1,0 вкл.	30
	св. 1,0 до 100 вкл.	25
Мёд, субпродукты, рыба, морепродукты	от 0,1 до 0,5 вкл.	44
	св. 0,5 до 1,0 вкл.	30
	св. 1,0 до 100 вкл.	25
Кишки и кишечное сырье	от 0,1 до 0,5 вкл.	23
	св. 0,5 до 1,0 вкл.	21
	св. 1,0 до 100 вкл.	14

15 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 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] Письмо 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)».

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

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