

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ 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 ФГБУ
«ВГНКИ», руководитель Органа ин-
спекции _____ Д.А.Рудняев
« 30 » августа 2020 г.



**Методические указания по определению содержания авиламицина в
пищевой продукции и кормах методом высокоэффективной жид-
костной хроматографии с масс-спектрометрическим детектирова-
нием**

МУ А-1/071

ФГБУ «ВГНКИ»

Учтенная копия № 905

Дата « 18 » декабря 2023 г.

г. Москва
2020

Разработчик: федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», Отдел безопасности пищевых продуктов (В.В. Тищенко, А.В. Сорокин, И.В. Батов, А.Е. Жедулов, Д.Ю. Некрасов, Е.А. Небера, Т.С. Грачева, А.Ю. Ефимов, Г.Л. Кожемякин).

123022, г. Москва, Звенигородское ш., 5, Телефон/факс: (499) 253-14-68/ (499) 256-22-50; E-mail: kanc@vgnki.ru

Аттестована ФГБУ «ВГНКИ», Свидетельство об аттестации № 310354-0063/2020 от 14.08.2020 г.

Регистрационный номер методики измерений в Федеральном реестре:
ФР.1.31.2020.37998

Содержание

1 Назначение и область применения	4
2 Нормативные ссылки	5
3 Требования к показателям точности измерений	7
4 Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, материалам, реактивам	8
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	10
10 Подготовка к выполнению измерений	11
11 Порядок выполнения измерений	18
12 Обработка результатов измерений	18
13 Оформление результатов измерений	20
14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории	20
Приложение А	21
Приложение Б	22

1 Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли авиламицина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и предназначен для организаций и учреждений, осуществляющих контроль безопасности пищевой продукции и кормов.

Авиламицин это смесь олигосахаридов группы ортосомицинов, которые продуцируются *Streptomyces viridochromogenes*. Маркерным соединением для авиламицина является дихлороизоэверниновая кислота. По содержанию дихлороизоэверниновой кислоты в объекте исследования рассчитывают содержание авиламицина. Расчет массовой доли проводится через коэффициент эквивалентности (фактор эквивалентности), который является отношением молярной массы авиламицина к молярной массе дихлороизоэверниновой кислоты ($M_{ав}/M_{д}$) и равен 5,6.

Диапазон измерений массовой доли дихлороизоэверниновой кислоты в мясе, мясной продукции, субпродуктах, жировой ткани и кормах составляет от 10 до 1000 мкг/кг. В пересчете на авиламицин - от 56 до 5600 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 Р 12.1.019–2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ Р 51447-99 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб.

ГОСТ Р 53228-2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания.

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 12.2.007.0-75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности.

ГОСТ 12.2.085-2017 Арматура трубопроводная. Клапаны предохранительные. Выбор и расчет пропускной способности.

ГОСТ 12.4.021-75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования.

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

ГОСТ 2768-84 Ацетон технический. Технические условия.

ГОСТ 4220-75 Калий двухромовокислый. Технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4814-57 Блоки мясные замороженные. Технические условия.

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

ГОСТ 6552-80 Кислота ортофосфорная. Технические условия.

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

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

ГОСТ 13496.0-2016 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб.

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

ГОСТ 28311-89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ 34037-2016 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 обеспечивает получение результатов измерений массовой доли дихлоризоэверниновой кислоты 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	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности*, $\pm U$, % 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	От 10 до 100 вкл.	35	11	15	30
	От 100 до 1000 вкл.	25	9	11	25
Субпродукты	От 10 до 100 вкл.	32	9	15	25
	От 100 до 1000 вкл.	28	8	13	22
Жировая ткань	От 10 до 100 вкл.	35	11	19	30
	От 100 до 1000 вкл.	24	5	12	14
Корма	От 10 до 100 вкл.	35	9	15	25
	От 100 до 1000 вкл.	19	5	8	14

* - соответствует характеристики погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$

Значения показателя точности (расширенной неопределенности) методики используют при:

- оформлению 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), номер в Государственном реестре средств измерений № 58075-14, и компьютером с установленным программным обеспечением Analyst версия не ранее 1.6.1 (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, заполненная обращенно-фазным сорбентом С18, длиной не менее 100 мм, диаметром не более 5 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: ЕК-300i (A&DCompany, Япония), номер в госреестре 25313-06)

4.1.7 Колбы 2-10-1 мерные по ГОСТ 1770.

4.1.8 Дозаторы механические автоматические переменной вместимости (2 – 20) мм³, (10 – 100) мм³, (100 – 1000) мм³, (500 – 5000) мм³.

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

4.2 Вспомогательное оборудование

4.2.1 Бутыль стеклянная БВ-1000 по ГОСТ 34037.

4.2.2 Пробирки полипропиленовые вместимостью 15,0 и 50 см³ с завинчивающимися крышками.

4.2.3 Вials (флаконы) стеклянные вместимостью 2,0 см³ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм.

4.2.4 Водяная баня, поддерживающая работу в температурном диапазоне от 70 до 75 °С.

4.2.5 Модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и устанавливаемой температурой термостатирования до 60 °С.

4.2.6 Центрифуга лабораторная рефрижераторная обеспечивающая ускорение не менее 4000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до комнатной температуры, совместимая с пробирками вместимостью 15 см³.

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

4.2.8 Картриджи для твердофазной очистки объемом от 6 см³, заполненные не менее 0,5 г силикагеля с размерами частиц от 60 до 200 мкм.

4.2.9 Встряхиватель (шейкер) вибрационный для пробирок орбитального типа движения с минимальной скоростью работы 1000 об/мин.

4.2.10 Система получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением очищенной воды (при 25 °С) 18 Мом*см.

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

4.2.12 Камера морозильная с цифровым контроллером температуры и рабочей температурой не выше -15 °С.

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

4.2.14 Устройство для твердофазной экстракции.

4.2.15 Гомогенизатор лабораторный.

4.2.16 Шприцы двухкомпонентные, 2 см³, медицинские.

4.3 Реактивы и материалы

4.3.1 метанол, квалификация "х.ч." по ГОСТ 6995 или имп. CAS № 67-56-1.

4.3.2 ацетон, квалификация "х.ч." по ГОСТ 2768 или имп. CAS № 67-64-1.

4.3.3 муравьиная кислота, квалификация "х.ч." по ГОСТ 5848 или имп. CAS № 64-18-6.

4.3.4 гидроксид натрия, квалификация "х.ч." по ГОСТ 4328 или имп. CAS № 1310-73-2.

4.3.5 этилацетат, квалификация "х.ч.", CAS № 141-78-6.

4.3.6 ортофосфорная кислота, квалификация "х.ч." по ГОСТ 6552 или имп. CAS № 7664-38-2.

4.3.7 гексан, квалификация "х.ч.", CAS № 110-54-3.

4.3.8 авиламицин, доля основного вещества 90%, имп. CAS № 11051-71-1.

4.3.9 дихлороизоэверниновая кислота-Д6, доля основного вещества 90%, имп. CAS № 21668-90-6.

4.3.10 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.3.11 Калий двуххромовокислый, "х.ч." по ГОСТ 4220.

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 содержания авиламицина выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Экстракт, содержащий авиламицин, подвергают гидролизу для образования дихлороизоэверниновой кислоты и очищают методом жидкостно-жидкостной и, при необходимости, твердофазной экстракции. Детектирование дихлороизоэверниновой кислоты 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

При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005-88.

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 хромато-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 12.2.085-2017. При выполнении измерений на хромато-масс-спектрометре соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.2.007.0-75 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 и подготовки проб к измерениям соблюдают следующие внешние условия:

температура воздуха	(20 ± 5) °С,
атмосферное давление	от 630 до 800 мм. рт. ст.,
относительная влажность воздуха	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 по ГОСТ Р 51447, ГОСТ 7269, ГОСТ 13496.0 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 двухромовокислого. 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 двухромовокислого

Навеску ($30,0 \pm 0,1$) г калия двухромовокислого переносят в фарфоровый стакан вместимостью $1,5 \text{ дм}^3$, добавляют с помощью мерного цилиндра 100 см^3 дистиллированной воды и растворяют навеску при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Затем осторожно, при постоянном перемешивании стеклянной палочкой, приливают к раствору калия двухромовокислого с помощью мерного цилиндра 1 дм^3 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 см^3 мерным цилиндром (4.1.9) отмеряют 995 см^3 деионизированной воды и добавляют $5,0 \text{ см}^3$ муравьиной кислоты (4.3.3), перемешивают. Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.2.7) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

Приготовление подвижной фазы Б

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см^3 мерным цилиндром (4.1.9) отмеряют 995 см^3 метанола (4.3.1) и $5,0 \text{ см}^3$ муравьиной кислоты (4.3.3), перемешивают. Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.2.7) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.3 Приготовление раствора 1 М гидроксида натрия

В мерную колбу на 500 см³ взвешивается 20 г гидроксида натрия (4.3.4). Доводится деионизированной водой до метки и перемешивается.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.4 Приготовление раствора 1 М ортофосфорной кислоты

В мерную колбу на 500 см³ приливается 400 см³ деионизированной воды, затем 33,9 см³ ортофосфорной кислоты (4.3.6). Раствор доводится деионизированной водой до метки и перемешивается.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.5 Приготовление смеси этилацетата, гексана и муравьиной кислоты в соотношении 99:900:1

В мерную колбу на 1000 см³ приливается 99 см³ этилацетата (4.3.5), 800 см³ гексана (4.3.7) и 1 см³ муравьиной кислоты. Раствор доводится гексаном до метки и перемешивается.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.6 Приготовление смеси этилацетата, гексана и муравьиной кислоты в соотношении 299:700:1

В мерную колбу на 1000 см³ приливается 299 см³ этилацетата (4.3.5), 600 см³ гексана (4.3.7) и 1 см³ муравьиной кислоты. Раствор доводится гексаном до метки и перемешивается.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.7 Приготовление рабочих растворов

10.2.7.1 Приготовление исходных растворов стандартного образца (C_o) авиламицина с массовой концентрацией 500 мкг/см³

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0 – 12 мг стандартного образца и переносят в полипропиленовую пробирку 50,0 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, г/моль;

Pa – степень чистоты стандартного образца, %;

ρ – плотность метанола, г/см³;

C – концентрация раствора C_o, г/см³.

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

При использовании стандартных образцов с точной заявленной массой, разведение исходного раствора производят непосредственно в таре производителя. Количество растворителя, необходимое для разведения рассчитывают по формуле 1. После растворения жидкий слой переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³.

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
30,0	0,7820

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус 20 °С в течение 1 года, перелитым в полипропиленовую 15 см³ пробирку с винтовой крышкой.

10.2.7.2 Приготовление раствора (C₁) с массовой концентрацией аналита в растворе 140 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 2,8 см³ раствора C₀ в мерную колбу вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус 20 °С в течение 6 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см³ пробирку с винтовой крышкой.

10.2.7.3 Приготовление раствора (C₂) с массовой концентрацией аналита в растворе 14 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C₁ в мерную колбу вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 3 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см³ пробирку с винтовой крышкой.

10.2.7.4 Приготовление раствора (C₃) с массовой концентрацией аналита в растворе 1,4 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C₂ в мерную колбу вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 1 недели, перелитым в полипропиленовую 15 см³ пробирку с винтовой крышкой.

10.2.7.5 Приготовление исходного раствора (D₀) внутреннего стандарта с массовой концентрацией аналита в растворе 500 мкг/см³

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0 – 12,0 мг внутреннего стандарта дихлоризоэверниновой кислоты (DIA-D6) и переносят в полипропиленовую пробирку 50,0 см³. В пробирку весовым методом добавляют метанол, масса которого рассчитывается по формуле (1).

Приготовленные растворы хранят в морозильной камере при температуре минус 20 °С в течение 1 года, перелитым в полипропиленовую 50 см³ пробирку с винтовой крышкой.

10.2.7.6 Приготовление раствора внутренних стандартов (D₁) с массовой концентрацией аналита в растворе 10 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают по 0,2 см³ раствора D₀ в мерную колбу вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 6 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см³ пробирку с винтовой крышкой.

10.2.7.7 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 $10,0 \text{ см}^3$, доводят до метки метанолом и 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.

10.2.8 Приготовление градуировочных растворов

10.2.8.1 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 10 мкг/кг ($G1$)

В пластиковую пробирку вместимостью $15,0 \text{ см}^3$ помещают $2,0 \text{ г}$ образца, не содержащего авиламицин (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,1 \text{ см}^3$ раствора D_2 (10.2.7.7) и $0,08 \text{ см}^3$ раствора C_3 (10.2.7.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.5.

Приготовленный образец допускается хранить в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.2.8.2 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 50 мкг/кг ($G2$)

В пластиковую пробирку вместимостью $15,0 \text{ см}^3$ помещают $2,0 \text{ г}$ образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,1 \text{ см}^3$ раствора D_2 (10.2.7.7) и $0,04 \text{ см}^3$ раствора C_2 (10.2.7.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.5.

Приготовленный образец допускается хранить в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.2.8.3 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 100 мкг/кг ($G3$)

В пластиковую пробирку вместимостью $15,0 \text{ см}^3$ помещают $2,0 \text{ г}$ образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,1 \text{ см}^3$ раствора D_2 (10.2.7.7) и $0,08 \text{ см}^3$ раствора C_2 (10.2.7.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.5.

Приготовленный образец допускается хранить в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.2.8.4 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 250 мкг/кг ($G4$)

В пластиковую пробирку вместимостью $15,0 \text{ см}^3$ помещают $2,0 \text{ г}$ образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,1 \text{ см}^3$ раствора D_2 (10.2.7.7) и $0,2 \text{ см}^3$ раствора C_2 (10.2.7.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.5.

Приготовленный образец допускается хранить в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.2.8.5 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 500 мкг/кг (G5)

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см³ помещают 2,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.7.7) и 0,04 см³ раствора C₁ (10.2.7.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.5.

Приготовленный образец допускается хранить в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.2.8.6 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 1000 мкг/кг (G6)

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см³ помещают 2,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.7.7) и 0,08 см³ раствора C₁ (10.2.7.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец допускается хранить в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.3 Подготовка прибора к измерениям

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

10.3.1 Рекомендуемые параметры настройки жидкостного хроматографа

температура колонки 40 °C;

скорость потока подвижной фазы 0,3 см³/мин.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: в начальный момент времени концентрация фазы А составляет 85%, затем до 4,9 мин идет градиентное уменьшение концентрации фазы А до 15%, с 4,9 до 5 мин концентрация фазы А возвращается к значению в 85%, с 5 до 8 мин идет уравнивание колонки в 85%-ой фазе А.

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

10.3.2 Рекомендуемые параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Таблица 3 – Параметры в режиме MRM в условиях электрораспыления

№	Определяемое вещество	Ион-предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	Потенциал декластеризации, В	Энергия столкновений, эВ / Потенциал на выходе из ячейки, В
1	Дихлороизоэверниновая кислота	249	190*	-60	-28/-15
			205	-60	-21/-13
2	Дихлороизоэверниновая кислота-Дб	255	193	-60	-28/-13
			211	-60	-21/-13

* - рекомендуемый дочерний ион для проведения количественного обсчета

Напряжение на зонде (IS):

+ 5500 В для положительного режима регистрации ионов;
Разрешение квадруполей Q1/Q3: единичное;
Поток газа для фрагментации (CAD): 6.

10.4 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 10.2.8. 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.

10.5 Подготовка проб

10.5.1 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, субпродуктов, жировой ткани и кормов

Образец предварительно очищают от грубой соединительной ткани. 100 г пробы измельчают на гомогенизаторе и взвешивают в полипропиленовой пробирке вместимостью 15,0 см³ (4.2.2) 2,0 г образца. Дозатором в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутреннего стандарта D₂ (10.2.7.7) и выдерживают 20 мин в темном месте. Осторожно приливают 5 см³ ацетона (4.3.2) и помещают пробирку на 10 мин в шейкер (4.2.9) для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Переливают органический слой в новую полипропиленовую пробирку, помещают ее на нагревательный модуль (4.2.5) и упаривают в токе азота при температуре до 60 °С досуха. К остатку приливают 2,5 см³ 1М NaOH (10.2.3), перемешивают в шейкере 5 с и выдерживают в водяной бане 70 минут при 70-75 °С (4.2.4). Охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору приливают 4 см³ этилацетата (4.3.5), помещают на шейкер на 10 минут, центрифугируют при 4000 об/мин, 4 °С и 10 минут. Верхний органический слой отбрасывают. рН раствора доводят до 3 раствором 1М Н₃РO₄ (примерно 1,7 см³) (10.2.4). Далее к раствору добавляют 3 см³ гексана, помещают на шейкер на 10 минут и центрифугируют 10 минут при 4000 об/мин и 4 °С. Гексан отбрасывают и экстрагируют дихлороизоэверниновую кислоту, добавляя к раствору 3 см³ этилацетата, перемешивая на шейкере 10 минут и центрифугируя при 4000 об/мин и 4 °С 10 минут. Слой этилацетата переносят в новую полипропиленовую пробирку и упаривают в токе азота при температуре менее 50 °С досуха.

Далее, в случае необходимости, возможно применение дополнительной очистки образцов с помощью этапа твердофазной экстракции на картриджах, заполненных силикагелем (10.5.2). Если в дополнительной очистке необходимость отсутствует, следует этап перерастворения (10.5.3).

10.5.2 Твердофазная очистка

К полученному остатку на стадии 10.4.1 приливают 2 см³ раствора смеси этилацетата, гексана и муравьиной кислоты 99/900/1 (10.2.5) и тщательно перемешивают, помещают на ультразвуковую баню на 1 минуту. Наносят раствор на картриджи, заполненные силикагелем (4.2.8), предварительно кондиционированные 5 см³ раствора смеси этилацетата, гексана и муравьиной кислоты 99/900/1. После прохождения раствора через картридж его промывают 5 см³ раствора смеси этилацетата, гексана и муравьиной кислоты 99/900/1 и элюируют 5 см³ раствора смеси этилацетата, гексана и муравьиной кислоты 299/700/1 (10.2.6) в новую полипропиленовую пробирку на 15 см³. Элюат упаривают в токе азота при температуре не более 50 °С.

10.5.3 Перерастворение образцов перед ВЭЖХ-МС/МС анализом

К полученному остатку после стадии 10.4.1 или 10.4.2 приливают 1 см³ раствора мобильной фазы А (10.2.2) и тщательно перемешивают, помещают на ультразвуковую баню на 1 минуту, фильтруют и переносят в виалу для автосамплера жидкостного хроматографа. Полученный раствор 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 программы Analyst и выдаются в виде массовой доли анализируемого вещества.

12.1 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).

12.2 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).

12.3 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

13.1 Результат анализа 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 дихлороизоэверниновой кислоты, для которых выполняется условие (2) или (3), мкг/кг;

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

13.2 В случае, если необходимо предоставить результаты, пересчитанные на авиламицин результат анализа представляют в следующем виде:

$$\bar{X}_{k,c} \cdot 5,6 \pm 0,01 \cdot U_p \cdot \bar{X}_{k,c} \cdot 5,6, \text{ при } P=0,95,$$

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

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

5,6 – фактор эквивалентности авиламицина к дихлороизоэверниновой кислоте.

13.3 В случае содержания дихлороизоэверниновой кислоты в образе более верхнего предела количественного определения, вносится запись: «более 1000 мкг/кг». В случае, содержания дихлороизоэверниновой кислоты в образце менее нижнего предела количественного определения, вносится запись: «менее 10 мкг/кг».

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 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.

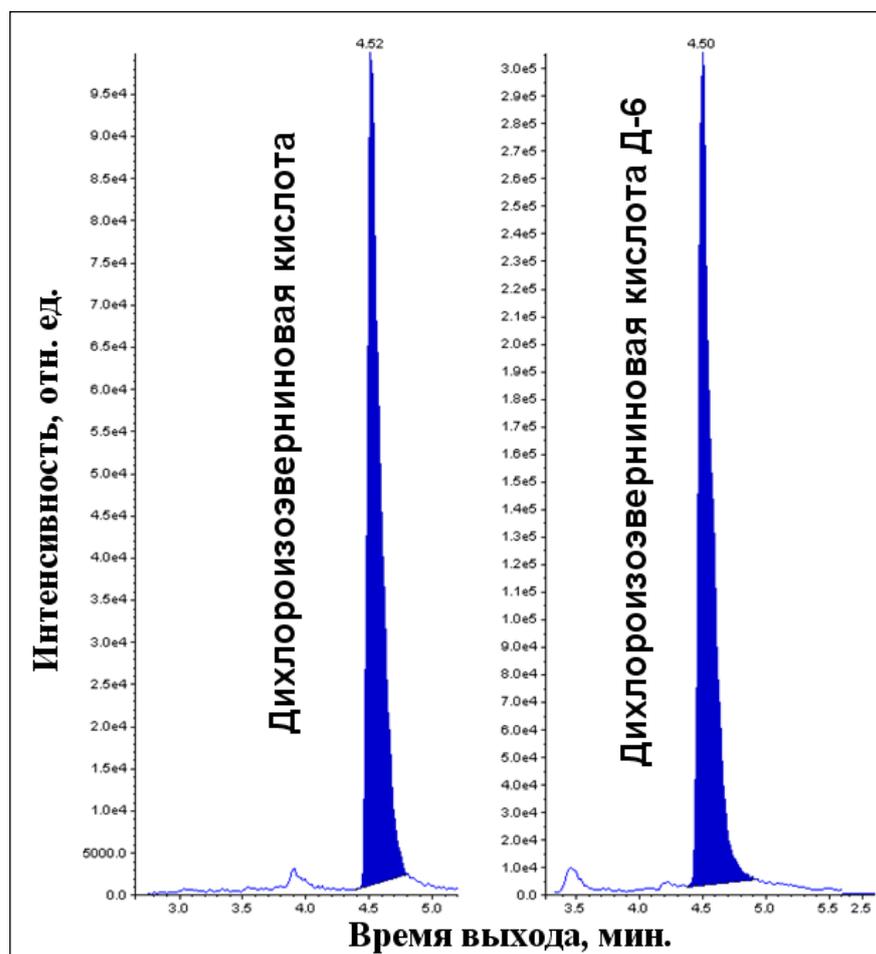
Приложение А
(информационное)
Библиография

[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».

Приложение Б (справочное)



Пример масс-хроматограммы дихлоризоэверниновой кислоты и внутреннего стандарта.