

**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

«27» ноября 2020 г.

**Методические указания по определению остаточного содержания
нитровина, 4-нитрофенолята и нифурстирената в продукции живот-
новодства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
с масс-спектрометрическим детектированием**

МУ А-1/072

**Москва
2020**

1 РАЗРАБОТЧИК

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).

2 СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

Методические указания аттестованы ФГБУ «ВГНКИ».

Свидетельство об аттестации № 310354-0073/2020 от 27.11.2020г

3 СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ

Регистрационный номер методики измерений в Федеральном информационном фонде измерений ФР.1.31.2021.39534

Содержание

1 Назначение и область применения	4
2 Нормативные ссылки	4
3 Требования к показателям точности измерения	6
4 Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, материалам, реактивам	7
5 Метод измерений	9
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	9
7 Требования к квалификации операторов	9
8 Требования к условиям измерений	9
9 Отбор и хранение проб	10
10 Подготовка к выполнению измерений	10
11 Порядок выполнения измерений	17
12 Обработка результатов измерений	17
13 Оформление результатов измерений	18
14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории	18
Приложение А	19

1 Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли нитровина, 4-нитрофенолята и нифурстирената 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 остаточного содержания нитровина, 4-нитрофенолята и нифурстирената методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Диапазон измерений массовой доли нитровина, 4-нитрофенолята и нифурстирената представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Диапазоны измерений массовой доли нитровина, 4-нитрофенолята и нифурстирената в различных матрицах

Соединение	Диапазон измерения в образцах мяса и мясных продуктов, рыбы, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах субпродуктов, яиц и яичных продуктов, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах молока и молочных продуктов, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах меда, мкг/кг
Нитровин	от 5 до 500	от 5 до 500	от 5 до 500	от 5 до 500
Нифурстиренат	от 1 до 500	от 1 до 500	от 1 до 500	от 1 до 500
4-нитрофенолят	от 1 до 500	от 1 до 500	от 1 до 500	от 1 до 500

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 12.1.019–2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

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

OIML R 76-1-2011 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). 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 4288-76 Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытаний

ГОСТ 4814-57 Блоки мясные замороженные. Технические условия

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

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

ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и 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 31720-2012 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа

ГОСТ 32951-2014 Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия

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

ГОСТ 19792-2017 Мёд натуральный. Технические условия

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

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 29245-91 Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей

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

ГОСТ Р 57901-2017 Яйца куриные пищевые повышенного качества. Технические условия

ТУ 6-09-06-1092-83 Ацетонитрил ОСЧ (особо чистый)

ГОСТ 5848-73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ФС.2.2.0020.18 Вода очищенная

Примечание¹ – 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 обеспечивает получение результатов измерений массовой доли нитровина, 4-нитрофенолята и нифурстирената с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2 – 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 $P = 0,95$, $n = 2$)
Нитровин					
Мясо, мясные продукты, рыба	От 5,0 до 25 вкл.	33	7	16	19
	Св. 25 до 500	17	6	7	17
Субпродукты, яйца и яичные продукты	От 5,0 до 50 вкл.	35	9	17	25
	Св. 50 до 500	21	6	10	17
Молоко и молочные продукты	От 5,0 до 25 вкл.	29	5	15	14
	Св. 25 до 500	16	3	8	8
Мёд	От 5,0 до 50 вкл.	25	6	11	17
	Св. 50 до 500	12	3	4	8
4-нитрофенолят					
Мясо, мясные продукты, рыба	От 1,0 до 500 вкл.	17	7	8	19
Субпродукты, яйца и яичные продукты	От 1,0 до 10 вкл.	26	7	13	19
	Св. 10 до 500	14	6	7	17

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

Молоко и молочные продукты	От 1,0 до 500 вкл.	20	7	8	19
Мёд	От 1,0 до 500 вкл.	35	5	17	14
Нифурстиренат					
Мясо, мясные продукты, рыба	От 1,0 до 10 вкл.	29	8	17	22
	Св. 10 до 500	19	8	9	22
Субпродукты, яйца и яичные продукты	От 1,0 до 10 вкл.	34	6	17	17
	Св. 10 до 500	18	7	9	19
Молоко и молочные продукты	От 1,0 до 500 вкл.	20	6	8	17
Мёд	От 1,0 до 500 вкл.	27	7	13	19

* - соответствует характеристики погрешности 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, вспомогательное оборудование

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 1.6.1 (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 обращенно-фазная длиной не менее 150 мм, с диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм.

4.1.4 Компьютер с установленным программным обеспечением.

4.1.5 Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

4.1.6 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).

4.1.7 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).

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

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

4.1.10 Бутыль стеклянная БВ-1000 по ГОСТ 34037.

4.1.11 Пробирки полипропиленовые вместимостью 15 см³ с завинчивающимися крышками.

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

4.1.13 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 60 мг (к примеру Oasis HLB).

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

4.1.15 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.

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

4.1.17 Микроцентрифуга лабораторная рефрижераторная со скоростью вращения не менее 15000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см³.

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

4.1.19 Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

4.1.20 Холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 5 °С.

4.1.21 Камера лабораторная морозильная с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С.

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

4.1.23 Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 см³.

4.1.24 Вакуумное устройство для твердофазной экстракции.

4.1.25 Гомогенизатор лабораторный.

4.2 Реактивы, материалы

4.2.1 метанол по ГОСТ 6995 , квалификация "х.ч.",

4.2.2 ацетонитрил по ТУ 6-09-06-1092-83, квалификация "х.ч.",

4.2.3 гексан по ТУ 2631-158-44493179-13, квалификация "х.ч.",

4.2.4 муравьиная кислота по ГОСТ 5848, квалификация "х.ч.",

4.2.5 нитровин, доля основного вещества 90%,

4.2.6 нифурстиренат, доля основного вещества 90%,

4.2.7 4-нитрофенолят, доля основного вещества 90%,

4.2.8 фуразолидон, доля основного вещества 90%,

4.2.9 нифуроксазид, доля основного вещества 90%.

Примечание 1 – допускается применение стандартных образцов веществ с содержаниями основного вещества, которые отличаются от приведенных выше (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

Измерения содержания 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 анализов и их изотопно-меченых аналогов следует проводить в вытяжном шкафу.

В связи с тем, что при работе на хромато-масс-спектрометре используются сжатые газы, следует соблюдать правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением по ГОСТ 12.2.085.

При выполнении измерений на хромато-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 выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

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

9 Отбор и хранение проб

Отбор и хранение проб проводят, руководствуясь следующими нормативными документами: ГОСТ 4288, ГОСТ 4814, ГОСТ 7269, ГОСТ 9792, ГОСТ 31720, ГОСТ 32951, ГОСТ 19792, ГОСТ Р 51447, ГОСТ 26809.1, ГОСТ Р 57901.

10 Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы.

10.1 Приготовление растворов

10.1.1 Приготовление подвижных фаз

Приготовление подвижной фазы А

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 995 см³ деионизированной воды, дозатором (4.1.9) добавляют 5 см³ муравьиной кислоты, перемешивают и дегазируют на ультразвуковой бане (4.1.16) в течение 5 мин.

Раствор годен к использованию в течение 1 месяца.

Приготовление подвижной фазы Б

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 995 см³ метанола, дозатором (4.1.9) добавляют 5 см³ муравьиной кислоты, перемешивают и дегазируют на ультразвуковой бане (4.1.16) в течение 5 мин.

Раствор годен к использованию в течение 1 месяца.

10.1.2 Приготовление вспомогательных растворов

Приготовление раствора ацетонитрил-вода в соотношении 4:1

В мерную колбу вместимостью 100 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 80 см³ ацетонитрила (4.2.2), доводят водой до метки, перемешивают.

Раствор годен к использованию в течение 1 месяца.

Приготовление раствора метанол-вода в соотношении 1:4

В мерную колбу вместимостью 100 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 20 см³ метанола (4.2.1), доводят водой до метки, перемешивают.

Раствор годен к использованию в течение 1 месяца.

10.1.3 Приготовление рабочих растворов

10.1.3.1 Приготовление исходного раствора стандартных образцов нитро-вина, нифурстирената и 4-нитрофенолята (C_0) с массовой концентрацией 1000 мкг/см³

На весах (4.1.6) взвешивают 8,0-12,0 мг стандартных образцов и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см³. В пробирки весовым методом добавляют метанол, масса которого рассчитывается по формуле (1):

$$m_p = \frac{m \cdot M_a \cdot P_a \cdot \rho}{M_c \cdot 100 \cdot C}, \quad (1)$$

где m_p – масса метанола, г;

m – масса стандартного образца, г;

M_a – молярная масса чистого вещества, г/моль;

M_c – молярная масса соли, г/моль;

P_a – степень чистоты стандартного образца, %;

ρ – плотность метанола, г/см³;

C – концентрация раствора C_0 , г/см³.

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.

Плотность метанола (ρ) указывают в зависимости от температуры воздуха в помещении в соответствии с таблицей 3

Таблица 3 – 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

Приготовленные растворы хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 1 года.

10.1.3.2 Приготовление раствора (C₁) с массовой концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята в растворе 10 мкг/см³ и концентрацией нитровина 50 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают по 0,1 см³ из растворов C₀ нифурстирената и 4-нитрофенолята и 0,5 см³ из раствора C₀ нитровина в мерную пробирку вместимостью 10 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленные растворы хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 6 месяцев.

10.1.3.3 Приготовление раствора (C₂) с массовой концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята в растворе 1 мкг/см³ и концентрацией нитровина 5 мкг/см³

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

Приготовленный раствор хранят при температуре минус -20 °C в течение 3 месяцев.

10.1.3.4 Приготовление раствора (C₃) с массовой концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята в растворе 0,1 мкг/см³ и концентрацией нитровина 0,5 мкг/см³

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

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °C в течение 1 недели.

10.1.3.5 Приготовление исходных растворов (D₀) внутренних стандартов с массовой концентрацией фуразолидона и нифуроксазида в растворах 1000 мкг/см³

На весах (4.1.6) взвешивают 8,0-12,0 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).

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

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

Дозатором переменного объема отбирают по 0,1 см³ растворов D₀ в мерную пробирку вместимостью 10 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус -20 °С в течение 6 месяцев.

10.1.3.7 Приготовление раствора внутренних стандартов (D₂) с массовой концентрацией аналитов в растворе 1 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора D₁ в мерную пробирку вместимостью 10 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 3 месяцев.

10.1.4 Приготовление градуировочных растворов G₁ – G₅

10.1.4.1 Приготовление образцов мышечной ткани, субпродуктов, яиц, молока и меда с концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята 500 нг/см³ (G₅)

На весах (4.1.7) взвешивают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк), помещают в пластиковый флакон вместимостью 15 см³. С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.7) и 0,05 см³ раствора С₁ (10.1.3.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.1.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4 °С 1 день.

10.1.4.2 Приготовление образцов мышечной ткани, субпродуктов, яиц, молока и меда с концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята 100 нг/см³ и нитро-вина 500 нг/см³ (G₄)

На весах (4.1.7) взвешивают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк), помещают в пластиковый флакон вместимостью 15 см³. С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.7) и 0,1 см³ раствора С₂ (10.1.3.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.1.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4 °С 1 день.

10.1.4.3 Приготовление образцов мышечной ткани, субпродуктов, молока, яиц и меда с концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята 10 нг/см³ и нитро-вина 50 нг/см³ (G₃)

На весах (4.1.7) взвешивают 1,0 г образца не содержащего искомым аналитов (бланк), помещают в пластиковый флакон вместимостью 15 см³. С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.7) и 0,1 см³ раствора C₃ (10.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4 °С 1 день.

10.1.4.4 Приготовление образцов мышечной ткани, субпродуктов, молока, яиц и меда с концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята 5 нг/см³ и нитровина 25 нг/см³ (G2)

На весах (4.1.7) взвешивают 1,0 г образца не содержащего искомым аналитов (бланк), помещают в пластиковый флакон вместимостью 15 см³. С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.7) и 0,05 см³ раствора C₃ (10.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.1.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4 °С 1 день.

10.1.4.5 Приготовление образцов мышечной ткани, субпродуктов, молока, яиц и меда с концентрацией нифурстирената и 4-нитрофенолята 1 нг/см³ и нитровина 5 нг/см³ (G1)

На весах (4.1.7) взвешивают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк), помещают в пластиковый флакон вместимостью 15 см³. С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.7) и 0,01 см³ раствора C₃ (10.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.1.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4 °С 1 день.

10.2 Подготовка прибора к измерениям

Подготовку хроматографической системы и масс-спектрометрического детектора к работе осуществляют в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора.

10.2.1 Параметры настройки жидкостного хроматографа

температура колонки 40 °С;

скорость потока подвижной фазы 0,3 см³/мин;

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: в начальный момент концентрация фазы А – 80 %, затем градиентное элюирование к 5 % фазе А до 8 минуты, с 8 по 10 минуту 5 %-я фаза А, с 10 по 10,5 минуты переход к 80 %-ой фазе А, с 10,5 по 18 минуты уравнивание колонки в 80 %-ой фазе А.

10.2.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Таблица 4 – Параметры в режиме MRM в условиях электрораспыления

№	Определяемое вещество	Ион-предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	Энергия столкновений, эВ
1	Нитровин	361,1	222	24

			302	26
2	4-нитрофенолят	138	107,9	-30
			91,9	-24
3	Нифурстиренат	258,1	214	-18
			184,1	-18
4	Нифуроксазид	276	121	24
5	Фуразолидон	226	95,1	17

Напряжение на зонде (IS):

5500 В для положительного режима регистрации ионов;

-4500 В для отрицательного режима регистрации ионов;

Разрешение квадруполей Q1/Q3: единичное;

Поток газа для фрагментации (CAD): 6.

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 10.1.4. Для приготовления проводят обработку "чистых" проб (бланков) согласно разделу 10.4, не содержащих действующих веществ, к которым перед обработкой добавляют раствор внутренних стандартов и рабочий раствор аналитов в количестве, необходимом для получения массовых концентраций в соответствующих пределах (10.1.4).

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 площади пика внутреннего стандарта этого вещества», при этом в программе указывают концентрации стандартов и внутреннего стандарта согласно Таблице 5. Для нитровина в качестве внутреннего стандарта следует использовать нифуроксазид, а для 4-нитрофенолята и нифурстирената – фуразолидон.

Таблица 5 – концентрации стандарта и внутреннего стандарта для занесения в программу обсчета

Градуировочный раствор	Концентрация внутреннего стандарта в градуировочном растворе (нг/см ³)	Концентрация нифурстирената и 4-нитрофенолята в градуировочном растворе (нг/см ³)	Концентрация нитровина в градуировочном растворе (нг/см ³)
G1	100	1	5
G2	100	5	25
G3	100	10	50
G4	100	100	500
G5	100	500	-

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

Для нахождения градуировочной характеристики анализируют градуировочные растворы. Подвижную фазу, реагенты и матрицу предварительно проверяют на наличие исследуемых аналитов или других соединений, мешающих определению.

10.4 Подготовка проб

10.4.1 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, рыбы, субпродуктов

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. 100 г пробы измельчают на гомогенизаторе (4.1.25) и взвешивают в полипропиленовой пробирке (4.1.11) 1,0 г образца. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутренних стандартов D₂ (10.1.3.7), помещают пробирку в шейкер на 10 минут для перемешивания.

Осторожно приливают 5 см³ смеси ацетонитрила с водой (4:1) (10.1.2) и помещают пробирку на 15 мин в шейкер (4.1.18) для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. Переливают экстракт в новую полипропиленовую пробирку, добавляют 5 см³ гексана (4.2.3) и помещают ее на шейкер на 10 минут. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С, затем гексановый слой отбрасывают и упаривают остаток в токе азота до 1 см³ при температуре 40 °С. К остатку приливают 1 см³ деионизированной воды, перемешивают в шейкере 5 с. Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Перед нанесением экстракта на картридж (4.1.13) последовательно кондиционируют сорбент 2 см³ метанола и 2 см³ деионизированной воды. Затем пропускают через картридж полученный экстракт (при процедуре очищения вакуум или избыточное давление не применяют). Промывают картридж 6 см³ раствора вода-метанол (4:1) (10.1.2), сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 10 мин и элюируют аналиты по 3 см³ ацетонитрила и метанола последовательно в новую полипропиленовую пробирку. Элюат помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе азота при температуре 40 °С до (0,2 - 0,3) см³. К полученному остатку приливают 0,5 см³ деионизированной воды, тщательно перемешивают, помещают в ультразвуковую баню на 1 минуту и переливают экстракт в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 см³, доводят объем водой до 1 см³ и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Дозатором переносят центрифугат в виалу для автосамплера жидкостного хроматографа. 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 г в полипропиленовой пробирке. Дозатором в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутренних стандартов D₂ (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

10.4.3 Обработка проб яиц и меланжа

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе, меланж тщательно перемешивают. Взвешивают 1,0 г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутренних стандартов D₂ (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

10.4.4 Подготовка проб мёда

Отобранную пробу меда тщательно перемешивают. Взвешивают 1,0 г пробы в полипропиленовой пробирке, добавляют 3 см³ деионизированной воды, помещают

пробирку в шейкер на 15 минут. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутренних стандартов D₂ (10.1.3) и перемешивают. Полученный экстракт наносят на картриджи и далее очищают методом ТФЭ по 10.4.1.

10.4.5 Подготовка проб молока, молочных продуктов

Отобранную пробу молока или молочных продуктов (сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245) перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают 1,0 г в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутренних стандартов D₂ (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

11 Порядок выполнения измерений

При выполнении измерений в инжектор хроматографа вводят анализируемый раствор, полученный в п. 10.4. Подвижную фазу и реагенты предварительно проверяют на наличие нитровина, 4-нитрофенолята и нифурстирената 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. При этом в программе, при обсчете, концентрация внутреннего стандарта в образцах и в калибровочных растворах принимается равной 100 нг/см³.

12.1 За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (2):

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

где X₁, X₂ – результаты параллельных определений массовой доли вещества, мкг/кг, r – значение предела повторяемости, % (таблица 2).

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 2).

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

12.5 Если результат превышает верхний предел измерения, то выдают результат в следующей формулировке: «Содержание аналита превышает верхний предел диапазона измерения методики».

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 12.1, 12.2, 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 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