

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,  
руководитель Испытательного центра



М.А. Гергель

» февраль 2022 г.

Методические указания по определению остаточного содержания  
клавулановой кислоты в продукции животноводства методом  
высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим  
детектированием

МУ А-1/073

Москва  
2021

## **1.РАЗРАБОТЧИК**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», отдел безопасности пищевой и кормовой продукции

123022, г. Москва, Звенигородское ш., 5,

Телефон/факс: (499) 253-14-68/ (499) 253-14-91

E-mail: vgnki@fsvps.gov.ru

## **2 СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ**

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 № 310354-0083/2022 от 25.02.2022

## **3 СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ**

Регистрационный номер методик измерений по Федеральному реестру  
ФР.1.31.2022.42837

# ОГЛАВЛЕНИЕ

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

## **Назначение и область применения**

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли клавулановой кислоты в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и предназначен для организаций и учреждений, осуществляющих контроль безопасности продукции животноводства.

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

Диапазон измерений массовой доли клавулановой кислоты в мясе, мясной продукции, молоке и молочной продукции, субпродуктах, яйцах, жировой ткани составляет от 50 до 1000 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 21748-2021 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 58144-2018 Вода дистиллированная. Технические условия

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

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

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

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 26809.2-2014 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 31467-2012 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям.

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

ГОСТ 31654-2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия

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

ГОСТ 28311-89<sup>1</sup> 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.

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

## Примечание<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Взамен с 01.03.2022 вводится в действие на территории Российской Федерации ГОСТ 28311-2021

<sup>2</sup> 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

### 3 Требования к показателям точности измерения

Настоящие методические указания имеют следующие показатели точности (таблица 1) и обеспечивает получение результатов измерений массовой доли клавулановой 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), $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости), $\sigma_R$ , %	Предел повторяемости, $r$ , % (при $P = 0,95$ , $n = 2$ )
Мясо, мясная продукция, молоко и молочная продукция, жировая ткань	От 50 до 500 вкл.	27	7	12	20
	От 500 до 1000 вкл.	19	3	9	8
Субпродукты, яйцо	От 50 до 500 вкл.	29	8	14	22
	От 500 до 1000 вкл.	20	6	9	17

\* - 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

---

заменен (изменен), то при пользовании настоящим документом на методику измерений следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссыльный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

## **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 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  $(40 \pm 10)$  °С.

4.1.3 Колонка хроматографическая, для нормально-фазной хроматографии заполненная силикагелем, длиной не менее 250 мм, диаметром не более 5 мм, с диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм (например, Kromasil 100 Sil 5  $\mu\text{m}$  250x4.0 mm Art. No MZ0511-250040; производитель MZ-Analysentechnik GmbH [www.mz-at.de](http://www.mz-at.de))

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: Discovery DV214C (Ohaus, Швейцария), номер в госреестре 33646-06).

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

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

4.1.8 Дозаторы механические автоматические переменной вместимости  $(2 - 20)$  мм<sup>3</sup>,  $(10 - 100)$  мм<sup>3</sup>,  $(100 - 1000)$  мм<sup>3</sup>,  $(500 - 5000)$  мм<sup>3</sup> по ГОСТ 28311.

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 50 и 15,0 см<sup>3</sup> с завинчивающимися крышками.

4.2.3 Вials (флаконы) стеклянные вместимостью 2,0 см<sup>3</sup> 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 со скоростью вращения не менее 4000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 см<sup>3</sup>.

4.2.7 Баня ультразвуковая с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 дм<sup>3</sup>.

4.2.8 Картриджи для твердофазной очистки объемом от 3 см<sup>3</sup>, заполненные не менее 0,06 г слабым ионообменным сорбентом (например, Oasis WAX 3 cc, 60 mg, Waters)

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 минус 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 см<sup>3</sup>, медицинские.

### **4.3 Реактивы и материалы**

4.3.1 Ацетонитрил, квалификация "х.ч., ТУ 2636-040-44493179-00 или имп. CAS № 75-05-8.

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

4.3.4 Кислота серная "х.ч."

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

4.3.6 клавулановат калия, доля основного вещества не менее 90%, имп. CAS № 61177-45-5

4.3.7 пенициллин G D7 этилпиперидиновая соль, доля основного вещества не менее 90%, имп CAS № 1217445-37-8

4.3.8 Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144

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

4.3.10 Вода деионизованная

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 иных средств измерений, стандартных образцов, материалов и реактивов с метрологическими характеристиками и характеристиками качества равными или превосходящими приведенные выше.

Примечание 3 – в качестве внутреннего стандарта допускается применение клавулановой кислоты D4

## **5 Метод измерений**

Измерение содержания клавулановой кислоты выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Экстракт, содержащий клавулановую кислоту, подвергают очистке методом твердофазной экстракции. Детектирование клавулановой кислоты 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 Приказ Федеральной службы по экологическому, технологическому и атомному надзору от 15 декабря 2020 года N 536 Федеральные нормы и правила в области промышленной безопасности "Правила промышленной безопасности при использовании оборудования, работающего под избыточным давлением, 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 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 в соответствии с ГОСТ Р 51447, ГОСТ 7269, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 26809.2, ГОСТ 31467, ГОСТ 31720, ГОСТ 31654, ГОСТ 4814 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 Раствор калия двуххромовокислого 3 %

Навеску ( $30,0 \pm 0,1$ ) г калия двуххромовокислого переносят в фарфоровый стакан вместимостью  $1,5 \text{ дм}^3$ , добавляют с помощью мерного цилиндра  $100 \text{ см}^3$  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  $1 \text{ дм}^3$  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

##### 10.2.2.1 Приготовление подвижной фазы А

В стеклянную бутылку вместимостью  $1000 \text{ см}^3$  мерным цилиндром отмеряют  $995 \text{ см}^3$  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 А при комнатной температуре – 1 месяц.

##### 10.2.2.2 Приготовление подвижной фазы Б

В стеклянную бутылку вместимостью  $1000 \text{ см}^3$  мерным цилиндром (4.1.9) отмеряют  $990 \text{ см}^3$  ацетонитрила (4.3.1) и добавляют  $10,0 \text{ см}^3$  муравьиной кислоты (4.3.3). Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.2.7) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы Б при комнатной температуре – 6 месяцев.

### **10.2.3 Приготовление вспомогательного раствора ацетонитрила**

В колбу 250 см<sup>3</sup> приливают ацетонитрил 100 см<sup>3</sup>, добавляют муравьиной кислоты 5 см<sup>3</sup>, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 неделя.

### **10.2.4 Приготовление раствора для экстракции**

В мерную колбу на 1000 см<sup>3</sup> приливают 900 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 100 см<sup>3</sup> раствора п.10.2.3, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 2 дня.

### **10.2.5 Приготовление раствора для разведения растворов стандартных образцов и промывки**

В мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> приливают 50 см<sup>3</sup> деионизованной воды, 50 см<sup>3</sup> ацетонитрила.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц.

### **10.2.6 Приготовление раствора для элюирования**

В колбу 250 см<sup>3</sup> приливают раствор для промывки (10.2.5) 100 см<sup>3</sup>, добавляют муравьиной кислоты 5 см<sup>3</sup>, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 неделя.

### **10.2.7 Приготовление рабочих растворов стандартных образцов**

10.2.7.1. Приготовление исходного раствора стандартного образца (С<sub>0</sub>) клавулановой кислоты с массовой концентрацией 500 мкг/см<sup>3</sup>

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0 – 12 мг стандартного образца и переносят в полипропиленовую пробирку 50,0 см<sup>3</sup>. В пробирку добавляют раствор ацетонитрила и деионизированной воды (10.2.5) из расчета 2,0 см<sup>3</sup> на 1,0 мг (формула (1)) стандартного образца в пересчете на чистое вещество (формула (2)) и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

$$V = 2m \quad (1)$$

где V – объем раствора (6.2.4), необходимый для приготовления раствора 500 мкг/см<sup>3</sup>;  
m – масса стандартного образца в пересчете на чистое вещество, мг;

$$m = \frac{M \cdot m_c \cdot P_a}{M_c \cdot 100} \quad (2)$$

где  $M$  – молярная масса чистого стандартного образца, г/моль;  
 $m_c$  – масса навески используемого стандартного образца, г;  
 $M_c$  – молярная масса используемого стандартного образца, г/моль;  
 $P_a$  – массовая доля основного вещества в стандартном образце, %.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 1 года, перелитым в полипропиленовую 15 см<sup>3</sup> пробирку с винтовой крышкой.

#### *10.2.7.2 Приготовление раствора (C1) с массовой концентрацией аналита в растворе 10 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают 0,2 см<sup>3</sup> раствора C<sub>0</sub> в мерную колбу вместимостью 10,0 см<sup>3</sup>, доводят до метки раствором для промывки (10.2.5), перемешивают.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 6 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см<sup>3</sup> пробирку с винтовой крышкой.

#### *10.2.7.3 Приготовление раствора (C2) с массовой концентрацией аналита в растворе 1 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см<sup>3</sup> раствора C<sub>1</sub> в мерную колбу вместимостью 10,0 см<sup>3</sup>, доводят до метки раствором для промывки (10.2.5), перемешивают.

Приготовленный раствор хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 1 месяца, перелитым в полипропиленовую 15 см<sup>3</sup> пробирку с винтовой крышкой.

#### *10.2.7.4. Приготовление исходного раствора (D0) внутреннего стандарта с массовой концентрацией аналита в растворе 1 мг/см<sup>3</sup>*

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0 – 12 мг внутреннего стандарта и переносят в полипропиленовую пробирку 50,0 см<sup>3</sup>. В пробирку добавляют раствор ацетонитрила и деионизированной воды (6.2.4) из расчета 1,0 см<sup>3</sup> на 1,0 мг внутреннего стандарта (формула (3)) и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

$$V = m \quad (3)$$

где  $V$  – объем раствора (6.2.4), необходимый для приготовления раствора 1 мг/см<sup>3</sup>;  
 $m$  – масса образца внутреннего стандарта, мг.

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

#### *10.2.7.5 Приготовление раствора внутренних стандартов (D1) с массовой концентрацией аналита в растворе 10 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают по 0,1 см<sup>3</sup> раствора D<sub>0</sub> в мерную колбу вместимостью 10,0 см<sup>3</sup>, доводят до метки раствором для промывки (10.2.5), перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 1 года, перелитым в полипропиленовую 15 см<sup>3</sup> пробирку с винтовой крышкой.

#### *10.2.7.6 Приготовление раствора внутреннего стандарта (D<sub>2</sub>) с массовой концентрацией аналита в растворе 1 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см<sup>3</sup> раствора D<sub>1</sub> в мерную колбу вместимостью 10,0 см<sup>3</sup>, доводят до метки раствором для промывки (10.2.5), перемешивают

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 6 месяцев, перелитым в полипропиленовую 15 см<sup>3</sup> пробирку с винтовой крышкой.

### **10.2.8 Приготовление градуировочных растворов**

#### *10.2.8.1 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 50 мкг/кг (G1)*

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см<sup>3</sup> помещают 1,0 г образца, не содержащего клавулановую кислоту (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.2.7.6) и 0,05 см<sup>3</sup> раствора C<sub>2</sub> (10.2.7.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5

#### *10.2.8.2 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 100 мкг/кг (G2)*

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см<sup>3</sup> помещают 1,0 г образца, не содержащего клавулановую кислоту (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.2.7.6) и 0,10 см<sup>3</sup> раствора C<sub>2</sub> (10.2.7.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

#### *10.2.8.3 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 250 мкг/кг (G3)*

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см<sup>3</sup> помещают 1,0 г образца, не содержащего клавулановую кислоту (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.2.7.6) и 0,25 см<sup>3</sup> раствора C<sub>2</sub> (10.2.7.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

#### *10.2.8.4 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 500 мкг/кг (G4)*

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см<sup>3</sup> помещают 1,0 г образца, не содержащего клавулановую кислоту (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.2.7.6) и 0,05 см<sup>3</sup> раствора C<sub>1</sub> (10.2.7.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

#### 10.2.8.5 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 750 мкг/кг (G5)

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см<sup>3</sup> помещают 1,0 г образца, не содержащего клавулановую кислоту (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.2.7.6) и 0,075 см<sup>3</sup> раствора C<sub>1</sub> (10.2.7.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

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

В пластиковую пробирку вместимостью 15,0 см<sup>3</sup> помещают 1,0 г образца, не содержащего клавулановую кислоту (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.2.7.6) и 0,10 см<sup>3</sup> раствора C<sub>1</sub> (10.2.7.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.

### 10.3 Подготовка к измерениям

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

#### 10.3.1 Рекомендуемые параметры настройки системы высокоэффективной жидкостной хроматографии

температура колонки 20 °С;

скорость потока подвижной фазы 0,4 см<sup>3</sup>/мин.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: с начального момента и до 1,0 минуты концентрация фазы А составляет 95 %, затем до 5,0 мин идет градиентное уменьшение концентрации фазы А до 0 %, с 5,0 до 10,0 мин изократический режим с 100 % фазы В, с 10,0 до 10,1 мин возврат к значению в фазы А 95%, с 10,1 до 14 мин идет уравнивание колонки в 95%-ой фазе А.

**Таблица 2 - Хроматографические условия разделения аналитов**

Время, мин.	Поток, см <sup>3</sup> /мин	Фаза А (об.%)	Фаза В (об.%)
0,0	0,4	95	5
5,0	0,4	0	100
10,0	0,4	0	100
10,1	0,4	95	5
14,0	0,4	95	5

Примечание - 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 - – Оптимизированные значения параметров источника ионизации

Температура источника (TEM):	400 °C
Напряжение на капилляре (IS):	4500 В
Разрешение Q1/Q3:	Unit
Значение вспомогательного газа (CUR):	25
Значение газа источника (GS1):	45
Значение распыляющего газа (GS2):	45
Значение газа ячейки коллизий (CAD):	High

Таблица 4 - Параметры в отрицательном 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	Клавулановая кислота	198.300	136.050*	-70	-10/-9
			107.980	-60	-18/-11
2	Пенициллин G-D7	340.000	199.050	-66	-15/-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 10.2.8. 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.

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 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, субпродуктов, яиц, жировой ткани.**

*10.5.1.1 Пробу измельчают на гомогенизаторе и 1,0 г пробы взвешивают в полипропиленовой пробирке вместимостью 15,0 см<sup>3</sup> (4.2.2).*

10.5.1.2 Дозатором в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> раствора внутреннего стандарта D<sub>2</sub> (10.2.7.6) и выдерживают 20 мин в темном месте. Приливают 3 см<sup>3</sup> раствора для экстракции (10.2.4) 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. Верхний слой наносят на патроны для ТФЭ (4.2.8), предварительно промытые 2 см<sup>3</sup> метанола, 2 см<sup>3</sup> ацетонитрила, 2 см<sup>3</sup> раствора для экстракции.<sup>3</sup> Далее патрон для ТФЭ промывают 2 см<sup>3</sup> раствора для промывки (10.2.5), патрон просушивают, элюируют 1 см<sup>3</sup> раствора для элюирования (10.2.6). Элюат фильтруют (4.2.13), фильтрат используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

### **10.5.2 Подготовка проб молока, молочных продуктов**

Отобранную пробу молока (сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245) перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают (1,0 ± 0,05) г в полипропиленовой пробирке. Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.5.1.2

## **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.

---

<sup>3</sup> В случае большого количества жировой фракции в верхнем слое (например, пробы консервированного тушеного мяса) допускается удаление ее экстракцией гексаном

## 12 Обработка результатов измерений

Результаты измерений обрабатываются с помощью программы Analyst 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 (4):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r, \quad (4)$$

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

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

Если условие (4) 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:

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}, \quad (5)$$

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

$CR_{0,95}$

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

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

для  $n = 4$

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

где  $\sigma_r$  – показатель повторяемости, % (таблица 1).

Если условие (5) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

### 13 Оформление результатов измерений

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

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

где  $\bar{X}_{k,c}$  – среднее арифметическое значение результатов  $n$  определений массовой доли клавулановой кислоты, для которых выполняется условие (4) или (5), мкг/кг;

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

В случае содержания клавулановой кислоты в определяемых образцах более верхнего предела количественного определения, вносится запись: «более 1000 мкг/кг». В случае, содержания клавулановой кислоты в образце менее нижнего предела количественного определения, вносится запись: «менее 50 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:

$$\left| X_1 - X_2 \right| \leq 0,01 R_{JI} \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (7)$$

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

$R_{JI}$  – 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, мясная продукция, молоко и молочная продукция, жировая ткань	От 50 до 500 вкл.	33
	От 500 до 1000 вкл.	24
Субпродукты, яйцо	От 50 до 500 вкл.	33
	От 500 до 1000 вкл.	24

## **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.

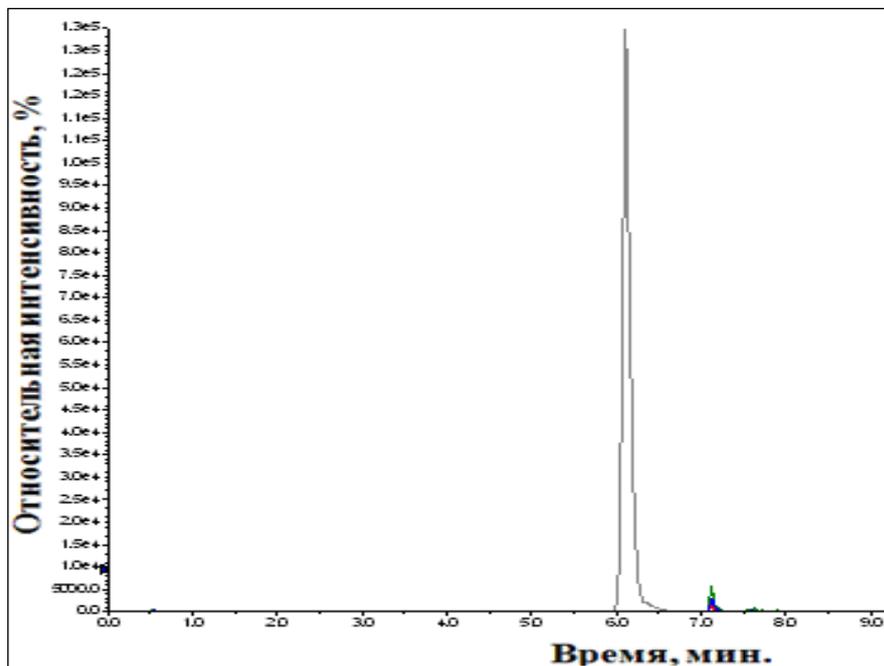
Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

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

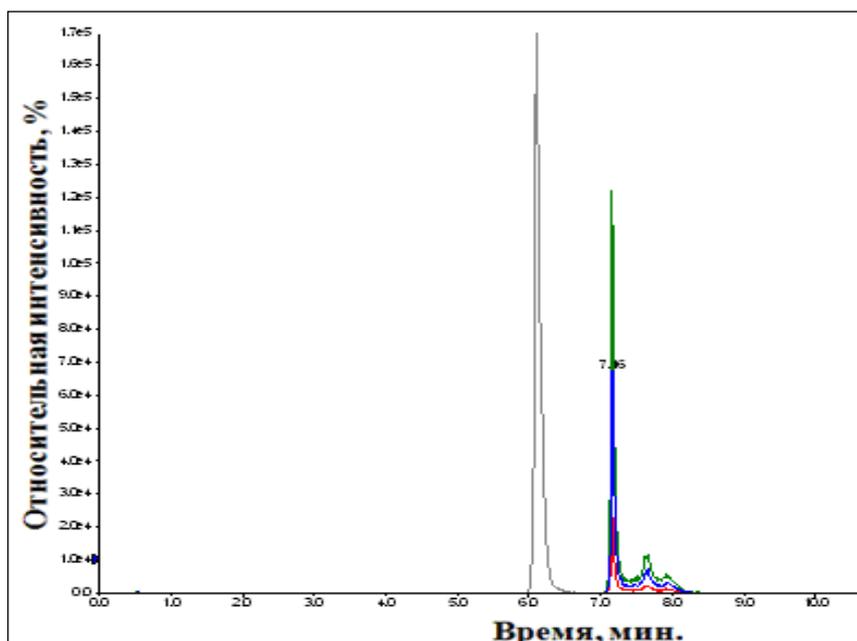
При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений

## Приложение А

(справочное)



Пример масс-хроматограммы клавулановой кислоты (50 мкг/кг;  $R_t = 7.20$  мин.) и внутреннего стандарта пенициллина G-D7 (50 мкг/кг;  $R_t = 6.10$  мин); матрица мышечная ткань (говядина); градиентный режим LC MS/MS NEG, Kromasil 100 Sil 5  $\mu\text{m}$  250x4.0



Пример масс-хроматограммы клавулановой кислоты (1000 мкг/кг;  $R_t = 7.20$  мин.) и внутреннего стандарта пенициллина G-D7 (50 мкг/кг;  $R_t = 6.10$  мин); матрица мышечная ткань (говядина); градиентный режим LC MS/MS NEG, Kromasil 100 Sil 5  $\mu\text{m}$  250x4.0

## 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».