

**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  
ФГБУ «ВГНКИ»**



**М.А. Гергель**

**« 25 » декабря 2020 г.**

**Методические указания по определению остаточного содержания  
рифампицина и рифаксимины в продукции животноводства методом  
высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-  
спектрометрическим детектированием**

**МУ А-1/078**

**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 № 310354-0068/2020 от 25.12.2020г

## **3 СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ**

Регистрационный номер методики измерений в Федеральном информационном фонде измерений ФР.1.31.2021.39542

## 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 рифампицина и рифаксимины 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 рифампицина и рифаксимины в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Диапазон измерений массовой доли рифампицина и рифаксимины представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Диапазоны измерений массовой доли рифампицина и рифаксимины в различных матрицах

Соединение	Диапазон измерения в образцах мяса и мясных продуктов, 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
Рифаксимин	от 1 до 500	от 1 до 500	от 1 до 500	от 1 до 500
Рифампицин	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 (с Изменением N 1)

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 Сосуды, работающие под давлением. Клапаны предохранительные. Требования безопасности

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 (с Изменениями N 1-10)

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 (с Изменениями N 1, 2)

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 (с Изменением N 1)

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 19792-2017 Мёд натуральный. Технические условия

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

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)

ФС.2.2.0020.18 Вода очищенная

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

Примечание – При пользовании настоящим документом на методику измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и

метрологии в сети Интернет или ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим документом на методику измерений следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3 Требования к показателям точности<sup>1</sup> измерения

Настоящие методические указания имеют следующие показатели точности (таблица 2) и обеспечивает получение результатов измерений массовой доли рифампицина и рифаксимицина 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), $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости), $\sigma_R$ , %	Предел повторяемости, $r$ , % (при $P = 0,95$ , $n = 2$ )
<b>Рифампицин</b>					
Мясо, мясные продукты	от 1,0 до 10,0	32	8	15	22
	св. 10,0 до 500	20	5	9	14
Субпродукты, яйца и яичные продукты	от 1,0 до 10,0	32	9	14	25
	св. 10,0 до 500	22	6	9	17
Молоко и молочные продукты	от 1,0 до 10,0	31	8	15	22
	св. 10,0 до 500	24	7	11	19
Мёд	от 1,0 до 10,0	30	8	14	22
	св. 10,0 до 500	20	5	9	14
<b>Рифаксимин</b>					
Мясо, мясные продукты	от 1,0 до 10,0	31	5	15	14
	св. 10,0 до 500	21	4	9	11
	от 1,0 до 10,0	30	5	15	15

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

Субпродукты, яйца и яичные продукты	св. 10,0 до 500	24	5	11	15
Молоко и молочные продукты	от 1,0 до 10,0	32	8	14	22
	св. 10,0 до 500	22	4	10	11
Мёд	от 1,0 до 10,0	30	8	14	22
	св. 10,0 до 500	23	9	10	25

\* - 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 1.6.2 (AB SCIEX, Канада, США). номер в Государственном реестре средств измерений № 58075-14.

4.1.2 Система высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до  $(50 \pm 1,0)$  °С.

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

4.1.4 Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

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

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

4.1.7 Колбы 2-10, 100-1 и цилиндры 1-1000-1 мерные по ГОСТ 1770.

4.1.8 Дозаторы автоматические одноканальные 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> с допустимой относительной погрешностью дозирования не более 1 %. по ГОСТ 28311

4.1.9 Бутыль стеклянная БВ-1000 по ГОСТ 34037.

4.1.10 Пробирки полипропиленовые вместимостью 15 см<sup>3</sup> с завинчивающимися крышками.

4.1.11 Виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 см<sup>3</sup> с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм.

4.1.12 Картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 см<sup>3</sup>, заполненные сорбентом на основе сополимера дивинилбензола и винилпирролидона, с частицами диаметром не более 50 мкм, массой 60 мг (к примеру Oasis HLB).

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

4.1.14 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>.

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

4.1.16 Микроцентрифуга лабораторная рефрижераторная со скоростью вращения не менее 10000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см<sup>3</sup>.

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

4.1.18 Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

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

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

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

4.1.22 Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 см<sup>3</sup>.

4.1.23 Вакуумное устройство для твердофазной экстракции.

4.1.24 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 рифампицин, доля основного вещества 90%,

4.2.4 рифаксимин, доля основного вещества 90%,

4.2.5 рифаксимин-Д6, доля основного вещества 90%,

4.2.6 рифампицин-Д3, доля основного вещества 90%.

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**

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 аналитов и их изотопно-меченых аналогов следует проводить в вытяжном шкафу.

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

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

## **7 Требования к квалификации операторов**

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

## 10 Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы.

### 10.1 Приготовление растворов

#### 10.1.1 Приготовление подвижных фаз

##### Приготовление подвижной фазы А

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см<sup>3</sup> мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 1000 см<sup>3</sup> деионизированной воды, 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 см<sup>3</sup> мерным цилиндром отмеряют 1000 см<sup>3</sup> метанола (4.2.1), дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5 мин.

Раствор годен к использованию в течение 1 месяца.

#### 10.1.2 Приготовление вспомогательных растворов

##### Приготовление раствора вода-метанол 1:1

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 50 см<sup>3</sup> 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 рифампицина и рифаксимина (C<sub>0</sub>) с массовой концентрацией 1000 мкг/см<sup>3</sup>*

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0-12,0 мг стандартных образцов и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см<sup>3</sup>. 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 стандартного образца, г/моль;  
 $P_a$  – степень чистоты стандартного образца, %;  
 $\rho$  – плотность метанола, г/см<sup>3</sup>;  
 $C$  – концентрация раствора  $C_0$ , г/см<sup>3</sup>.

Плотность метанола ( $\rho$ ) указывают в зависимости от температуры воздуха в помещении в соответствии с Таблицей 3.

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 см<sup>3</sup>.

Таблица 3 – Зависимость плотности метанола от температуры воздуха в помещении.

Температура воздуха, °С	Плотность метанола ( $\rho$ ), г/см <sup>3</sup>
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 (C<sub>1</sub>) с массовой концентрацией аналитов в растворе 10 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают 0,1 см<sup>3</sup> из каждого раствора C<sub>0</sub> в мерную пробирку вместимостью 10 см<sup>3</sup>, 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 (C<sub>2</sub>) с массовой концентрацией аналитов 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 пробирку вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят до метки метанолом и перемешивают.

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

#### *10.1.3.4 Приготовление раствора (C<sub>3</sub>) с массовой концентрацией аналитов в растворе 0,1 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см<sup>3</sup> раствора C<sub>2</sub> в мерную пробирку вместимостью 10 см<sup>3</sup>, 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 (D<sub>0</sub>) внутренних стандартов с массовой концентрацией рифампицина-ДЗ и рифаксимины-Дб в растворах 1000 мкг/см<sup>3</sup>*

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0-12,0 мг внутренних стандартов аналитов и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см<sup>3</sup>. 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 ( $D_1$ ) с массовой концентрацией аналитов в растворе 10 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают по 0,1 см<sup>3</sup> растворов  $D_0$  в мерную пробирку вместимостью 10 см<sup>3</sup>, 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 ( $D_2$ ) с массовой концентрацией аналитов в растворе 1 мкг/см<sup>3</sup>*

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см<sup>3</sup> раствора  $D_1$  в мерную пробирку вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят до метки метанолом и перемешивают.

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

### **10.1.4 Приготовление градуировочных растворов $G_1 - G_5$**

#### *10.1.4.1 Приготовление образцов мышечной ткани, субпродуктов, яиц, молока и мёда с концентрацией аналитов 500 нг/мл ( $G_5$ )*

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $D_2$  (10.1.3.7) и 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $C_1$  (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 мёда с концентрацией аналитов 100 нг/мл ( $G_4$ )*

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $D_2$  (10.1.3.7) и 0,1 см<sup>3</sup> раствора  $C_2$  (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 мёда с концентрацией аналитов 10 нг/мл ( $G_3$ )*

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $D_2$  (10.1.3.7) и 0,1 см<sup>3</sup> раствора  $C_3$

(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 мёда с концентрацией аналитов 5 нг/мл (G2)*

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.1.3.7) и 0,05 см<sup>3</sup> раствора C<sub>3</sub> (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 аналитов 1 нг/мл (G1)*

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> (10.1.3.7) и 0,01 см<sup>3</sup> раствора C<sub>3</sub> (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 масс-спектрометра к работе осуществляют в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора.

*10.2.1 Параметры настройки системы высокоэффективной жидкостной хроматографии*

температура колонки 40 °С;

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

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: в начальный момент и до 1,0 мин элюирование в 60%-ной мобильной фазе А, с 1,0 по 8,0 мин градиентное элюирование к 100% мобильной фазы Б, с 8,0 по 9,0 мин элюирование в 100%-ной мобильной фазе Б, с 9,0 по 9,10 мин переход к элюированию в 60%-ной мобильной фазе А, с 9,10 по 15,0 мин уравнивание колонки в 60%-ной мобильной 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	Рифаксимин	786,4	754,4	29
			362,3	43
2	Рифампицин	823,4	791,5	23
			399,3	32

3	Рифаксимин-Дб	792,4	760,4	29
4	Рифампицин-ДЗ	794,5	794,5	23

Напряжение на зонде (IS):

+ 5500 В для положительного 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.

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

Градуировочный раствор	Концентрация внутреннего стандарта в градуировочном растворе (нг/мл)	Концентрация стандарта в градуировочном растворе (нг/мл)
G1	50	1
G2	50	5
G3	50	10
G4	50	100
G5	50	500

При построении градуировочной зависимости используют линейную регрессию, при этом коэффициент 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, субпродуктов**

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. 100 г пробы измельчают на гомогенизаторе (4.1.25) и взвешивают на весах (4.1.7) в полипропиленовой пробирке (4.1.11) ( $1,0 \pm 0,05$ ) г образца. Дозатором переменного объема в пробирку вносят  $0,05 \text{ см}^3$  раствора внутренних стандартов  $D_2$  (10.1.3.7), помещают пробирку в шейкер на 10 минут для перемешивания. Осторожно приливают  $3 \text{ см}^3$  ацетонитрила (4.2.2) 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  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Переливают органический слой в новую полипропиленовую пробирку, помещают ее на нагревательный модуль (4.1.14) и упаривают в токе азота при температуре  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $0,2-0,3 \text{ см}^3$ . К остатку приливают  $2 \text{ см}^3$  деионизированной воды, перемешивают в шейкере 5 с и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Перед нанесением экстракта на картридж (4.1.13) последовательно кондиционируют сорбент  $2 \text{ см}^3$  метанола и  $2 \text{ см}^3$  деионизированной воды. Затем пропускают через картридж полученный экстракт (при процедуре очищения вакуум или избыточное давление не применяют). Промывают картридж  $3 \text{ см}^3$  раствора вода-метанол 1:1 (10.1.2), сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 10 мин и элюируют аналиты двумя порциями ацетонитрила по  $3 \text{ см}^3$  в новую полипропиленовую пробирку. Элюат помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе азота при температуре  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $0,2 - 0,3 \text{ см}^3$ . К полученному остатку приливают  $0,5 \text{ см}^3$  раствора мобильной фазы А (10.1.1), тщательно перемешивают, помещают в ультразвуковую баню на 1 минуту и переливают экстракт в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью  $1,5 \text{ см}^3$ , доводят объем фазой А до  $1 \text{ см}^3$  и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин при температуре  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Дозатором переменного объема переносят центрифугат в виалу для автосамплера системы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученный раствор используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

### **10.4.2 Подготовка проб яичного порошка**

Отобранную пробу яичного порошка перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят  $0,05 \text{ см}^3$  раствора внутренних стандартов  $D_2$  (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 ( $1,0 \pm 0,05$ ) г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят  $0,05 \text{ см}^3$  раствора внутренних стандартов  $D_2$  (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  $(1,0 \pm 0,05)$  г пробы в полипропиленовой пробирке, добавляют 3 см<sup>3</sup> деионизированной воды, помещают пробирку в шейкер на 15 минут. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> раствора внутренних стандартов D<sub>2</sub> (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 (сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245) перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают  $(1,0 \pm 0,05)$  г в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> раствора внутренних стандартов D<sub>2</sub> (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

### 11 Порядок выполнения измерений

При выполнении измерений в инжектор системы высокоэффективной жидкостной хроматографии вводят анализируемый раствор, полученный в п. 10.4. Подвижную фазу и реагенты предварительно проверяют на наличие рифаксимины и рифампицина 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 50 нг/см<sup>3</sup>.

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  $X_1, X_2$  – 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  $\sigma_r$  – показатель повторяемости, % (таблица 2).

12.3 Если условие (3) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют 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