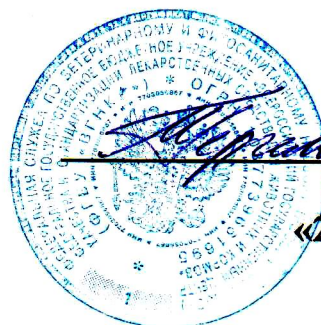


**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ  
НАДЗОРУ  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)**

**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**

**«29» декабря 2020 г.**

**Методические указания по определению остаточного содержания красителей в  
продукции аквакультуры методом высокоэффективной жидкостной хромато-  
графии с масс-спектрометрическим детектированием**

**МУ А-1/080**

**МОСКВА 2020 г**

Методика измерения массовой доли красителей в продукции аквакультуры методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Разработчик: федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (Сорокин А.В., Батов И.В., Жедулов А.Е., Некрасов Д. Ю.)

123022, г. Москва, Звенигородское ш., 5

Телефон/факс: (495) 982-50-84, (499) 253-14-68, (499) 253-14-91

E-mail: [kanc@vgnki.ru](mailto:kanc@vgnki.ru).

Аттестована ФГБУ «ВГНКИ», Свидетельство об аттестации  
№ 310354-0070/2020 от 29 декабря 2020 г.

Регистрационный номер методики измерений по Федеральному реестру  
ФР.1.31.2021.39559

---

## Содержание

1 Назначение и область применения .....	5
2 Нормативные ссылки .....	5
3 Метрологические характеристики .....	7
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы.....	8
4.1 Средства измерений .....	8
4.2 Вспомогательное оборудование.....	8
4.3 Материалы и реактивы.....	9
5 Метод измерений .....	11
6 Требования безопасности и охрана окружающей среды .....	11
7 Требования к квалификации операторов .....	11
8 Требования к условиям измерений.....	11
9 Отбор и хранение проб.....	12
10 Подготовка к выполнению измерений .....	12
10.1 Приготовление растворов .....	12
10.1.1 Приготовление рабочих растворов.....	12
10.1.2 Приготовление подвижной фазы .....	12
10.1.3 Приготовление рабочих растворов.....	12
10.1.4 Приготовление градуировочных растворов красителей ( $G_1 - G_6$ ) .....	14
10.2 Подготовка прибора к измерениям.....	15
10.3 Установление градуировочной характеристики .....	17
10.4 Подготовка проб .....	17
11 Выполнение измерений.....	18
12 Обработка результатов измерений .....	18
13 Оформление результатов измерений.....	19
14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории.....	20

## Введение

Красители широко применяются при производстве аквакультуры, для профилактики и лечения инфекционных болезней рыб и водных беспозвоночных. Вместе с этим, красители могут обладать токсичным действием, накапливаться в окружающей среде, а также загрязнять продукцию аквакультуры. Некоторые из красителей являются веществами с доказанным канцерогенным эффектом, такие как малахитовый зеленый – представитель группы трифенилметановых красителей. Попадая в организм аквакультуры, некоторые красители метаболизируются до лейко- метаболитов. В связи с канцерогенным и генотоксическим действием некоторых красителей, применение этих соединений запрещено в США, Канаде, ЕС и других странах. Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA) отнесло ряд новых и уже используемых в аквакультуре красителей к потенциальным загрязнителям аквакультуры, способных оказывать вредное воздействие на здоровье потребителя. Данная методика позволяет определять количественное содержание 15 красителей, включая 2 метаболита: лейкомалахитовый зеленый и лейкокристаллический фиолетовый в продукции аквакультуры.

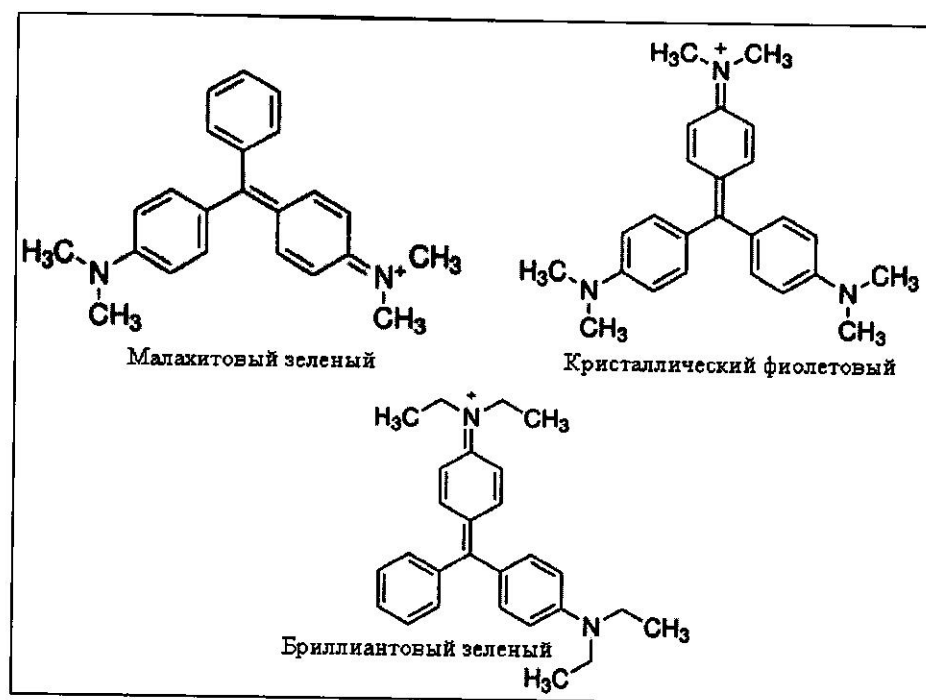


Рисунок 1 – Структуры некоторых определяемых красителей



## **1 Назначение и область применения**

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовых долей красителей в продукции аквакультуры методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и предназначен для организаций и учреждений, осуществляющих контроль безопасности и качества пищевой продукции.

Диапазон измерения массовых долей красителей по данной методике составляет: малахитового зеленого (MG), лейкомалахитового зеленого (LMG), кристаллического фиолетового (CV), лейкокристаллического фиолетового (LCV), бриллиантового зеленого (BG), диметилтионина (Azure A), метиленовой лазури В (Azure B), этилового фиолетового (EV), метиленового синего (MB), виктории синего В (Victoria Blue B, Basic Blue 26), виктории синего R (Victoria Blue R, Basic Blue 11), основного синего 7 (Victoria Pure Blue BO) от 0,25 мкг/кг до 10 мкг/кг; для 9-аминоакридина (9-АМА) и акрифлавина (ACR) от 1,0 мкг/кг до 40 мкг/кг; для парарозанилина основания (PB) от 0,5 мкг/кг до 20 мкг/кг.

## **2 Нормативные ссылки**

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

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 12.1.009-2017 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Термины и определения;

ГОСТ 12.2.007.0-75 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Изделия электротехнические. Общие требования безопасности;

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

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;

ГОСТ 7631-2008 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Методы определения органолептических и физических показателей;

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;

ГОСТ 26678-85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия;

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

ГОСТ 29169-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой;

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

ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике;

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

ТУ 6-09-5472-90 Тара стеклянная для химических реактивов и особо чистых веществ;

ФС.2.2.0020.18 Вода очищенная.

**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 Метрологические характеристики

Настоящая методика обеспечивает выполнение измерений массовых долей красителей с расширенной неопределенностью результатов измерений при коэффициенте охвата  $k = 2$ , указанной в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели точности<sup>1</sup> методики (значения относительной расширенной неопределенности результатов измерений, относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости).

Наименование соединения	Диапазон измерений, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности <sup>1</sup> , $\pm U$ , % 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 $P = 0,95$ , $n = 2$ )
Малахитовый зеленый	от 0,25 до 1,0 вкл.	33	12	16	33
	св. 1,0 до 10 вкл.	18	6	9	17
Кристаллический фиолетовый	от 0,25 до 1,0 вкл.	31	11	15	30
	св. 1,0 до 10 вкл.	19	8	9	22
Бриллиантовый зеленый	от 0,25 до 1,0 вкл.	32	12	16	33
	св. 1,0 до 10 вкл.	22	10	11	28
Акрифлавин	от 1,0 до 4,0 вкл.	34	12	16	33
	св. 4,0 до 40 вкл.	15	6	7	17
Диметилтионин (Azure A)	от 0,25 до 1,0 вкл.	29	12	14	33
	св. 1,0 до 10 вкл.	23	5	11	14
Метиленовая лазурь В (Azure B)	от 0,25 до 1,0 вкл.	27	10	13	28
	св. 1,0 до 10 вкл.	13	10	11	28
9-аминоакридин	от 1,0 до 4,0 вкл.	33	13	16	36
	св. 4,0 до 40 вкл.	16	5	8	14
Этиловый фиолетовый	от 0,25 до 1,0 вкл.	31	14	15	39
	св. 1,0 до 10 вкл.	23	10	11	28
Метиленовый синий	от 0,25 до 1,0 вкл.	31	10	15	28
	св. 1,0 до 10 вкл.	23	10	11	28
Парарозанилин основание	от 0,5 до 4,0 вкл.	31	12	15	33
	св. 4,0 до 20 вкл.	19	7	9	19
Виктория синий В	от 0,25 до 1,0 вкл.	27	6	13	17
	св. 1,0 до 10 вкл.	13	5	6	14

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

Таблица 1, продолжение

Наименование соединения	Диапазон измерений, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности*, $\pm U$ , % при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma$ , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости), $\sigma_R$ , %	Предел повторяемости, $r$ , % (при $P = 0,95$ , $n = 2$ )
Виктория синий R	от 0,25 до 1,0 вкл.	24	7	11	19
	св. 1,0 до 10 вкл.	12	5	6	14
Основной синий 7	от 0,25 до 1,0 вкл.	26	7	13	19
	св. 1,0 до 10 вкл.	18	7	9	19
Лейкомалахитовый зеленый	от 0,25 до 1,0 вкл.	27	7	13	19
	св. 1,0 до 10 вкл.	19	7	9	19
Лейкокристаллический фиолетовый	от 0,25 до 1,0 вкл.	27	7	13	19
	св. 1,0 до 10 вкл.	18	7	9	19

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

## 4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

### 4.1 Средства измерений

4.1.1 Жидкостной хроматограф Agilent Infinity 1290 (Infinity 1260), (США) с колонкой хроматографической Eclipse Plus C18 RRHD (1,8 мкм 2,1×50 мм) (Agilent, США), масс-спектрометрическим детектором с источником ионизации типа элетроспрей AB Sciex 6500, (США), в комплекте с программным обеспечением Analyst. Диапазон измерений значений, а.е.м. от 90 до 400 в режиме получения ионов фрагментов. Номер в Государственном реестре средств измерений № 58075-14.

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

4.1.3 Весы EK-300i (A&D Company, Япония), номер в госреестре 25313-06.

4.1.4 Одноканальные дозаторы переменного объема: (5 – 50) мм<sup>3</sup>, (10 – 100) мм<sup>3</sup>, (20 – 200) мм<sup>3</sup>, (100 – 1000) мм<sup>3</sup>, (500 – 5000) мм<sup>3</sup> по ГОСТ 28311.

4.1.5 Колбы мерные 1-10-1 по ГОСТ 1770.

4.1.6 Цилиндры мерные 1-50-1, 1-1000-1 по ГОСТ 1770.

### 4.2 Вспомогательное оборудование

4.2.1 Вертикальный шейкер, модель Reax 2 фирмы Heidolph.

4.2.2 Шейкер вортексного типа, с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2500 об/мин, модель Reax control фирмы Heidolph.

4.2.3 Вертикальный шейкер, модель Multi Reax фирмы Heidolph.

4.2.4 Центрифуга лабораторная рефрижераторная с ротором и адаптерами для пробирок вместимостью 15 см<sup>3</sup>, обеспечивающая скорость вращения 4750 об/мин с контроллером температуры в диапазоне от 4 до 25 °С, фирмы Thermo Scientific.

4.2.5 Система получения деионизованной воды высокой чистоты, модель Arim Mini фирмы Sartorius.

4.2.6 Холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 5 °С по ГОСТ 26678.

4.2.7 Бутыль стеклянная БВ-1000 по ТУ 6-09-5472-90.

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

4.2.9 Пробирки полипропиленовые вместимостью 50 см<sup>3</sup> с завинчивающимися крышками.

4.2.10 Насадки одноразовые на одноканальные дозаторы переменного объёма.

4.2.11 Пробирки для автоматического устройства ввода проб, вместимостью 2 см<sup>3</sup> с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм.

4.2.12 Пробирки микроцентрифужные, вместимостью 2 см<sup>3</sup>.

4.2.13 Шприц медицинский, одноразовый, двухкомпонентный объемом 2 см<sup>3</sup>.

4.2.14 Шприцевой фильтр, с мембраной 0,22 мкм, тип PTFE, диаметр 13 мм.

4.2.15 Баня ультразвуковая.

### 4.3 Материалы и реактивы

4.3.1 Ацетонитрил для ВЭЖХ-МС с массовой долей основного вещества не менее 99 % CAS № 75-05-8.

4.3.2 Муравьиная кислота для ВЭЖХ-МС с массовой долей основного вещества не менее 99 %, CAS № 64-18-6.

4.3.3 Ацетат аммония с массовой долей основного вещества не менее 99 % CAS № 631-61-8.

4.3.4 Кислота уксусная с массовой долей основного вещества не менее 99 % CAS № 64-19-7.

4.3.5 Натрия сульфат, безводный, с массовой долей основного вещества не менее 99 % CAS № 7757-82-6.

4.3.6 Смесь из б/в магния сульфата и натрия ацетата (в соотношении 6 г/1,5 г), Sorire QuEChERS COQP6150, либо COQS6150.

4.3.7 Смесь из 50 мг PSA, 50 мг C18, 150 мг магния сульфата б/в, Sorire QuEChERS COQ002033H.

4.3.8 Лейкомалахитовый зеленый с массовой долей основного вещества не менее 98,0% CAS № 129-73-7.

4.3.9 Лейкомалахитовый зеленый-Д<sub>5</sub> с массовой долей основного вещества не менее 95,0% CAS № 1173021-13-0.

4.3.10 Малахитовый зеленый хлорид с массовой долей основного вещества не менее 90% CAS № 569-64-2.

4.3.11 Малахитовый зеленый-D<sub>5</sub> пикрат, с массовой долей основного вещества не менее 90% CAS №1258668-21-1.

4.3.12 Лейкокристаллический фиолетовый с массовой долей основного вещества не менее 90.0% CAS № 603-48-5.

4.3.13 Лейкокристаллический фиолетовый-D<sub>6</sub> с массовой долей основного вещества не менее 95,0 %. CAS № 1173023-92-1.

4.3.14 Бриллиантовый зеленый сульфат с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 633-03-4.

4.3.15 Кристаллический фиолетовый с массовой долей основного вещества не менее 90.0% CAS № 548-62-9.

4.3.16 Кристаллический фиолетовый-D<sub>6</sub> с массовой долей основного вещества не менее 90.0%.

4.3.17 Диметилтионин (Azure A) с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 531-53-3.

4.3.18 Метиленовая лазурь В (Azure B) с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 531-55-5.

4.3.19 Этиловый фиолетовый (Basic violet 4) с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 2390-59-2.

4.3.20 Метиленовый синий с массовой долей основного вещества не менее 80 %. CAS № 122965-43-9.

4.3.21 Виктория синий В (Victoria Blue B, Basic Blue 26) с массовой долей основного вещества не менее 80 %. CAS № 2580-56-5.

4.3.22 Виктория синий R (Victoria Blue R, Basic Blue 11) с массовой долей основного вещества не менее 80 %. CAS № 2185-86-6.

4.3.23 Основной синий 7 (Victoria Pure Blue BO) с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 2390-60-5.

4.3.24 9-аминоакридин с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 90-45-9.

4.3.25 Акрифлавин с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 8048-52-0.

4.3.26 Парарозанилин основание с массовой долей основного вещества не менее 90 %. CAS № 467-62-9.

4.3.27 Ацетон с массовой долей основного вещества не менее 99 %. CAS № 67-64-1.

4.3.28 Метанол с массовой долей основного вещества не менее 99 %. CAS № 67-56-1.

Примечание – Допускается применение других средств измерений, вспомогательных устройств, материалов и реактивов с метрологическими и техническими характеристиками не хуже приведенных выше.



## 5 Метод измерений

Определение массовых долей красителей выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Детектирование анализируемых веществ проводят в режиме получения дочерних ионов продуктов. Используя полученные с применением метода внутреннего стандарта градуировочные характеристики, по площади пиков идентифицированных соединений, находят их количественное содержание.

## 6 Требования безопасности и охрана окружающей среды

Используемые в работе реактивы содержат вещества, относящиеся к 1 и 2 классам опасности, при работе с ними 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 хроматографе с масс-спектрометрическим детектором используют сжатые газы, следует соблюдать ГОСТ 12.2.085. При выполнении измерений 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 допускают лиц, прошедших соответствующее обучение и освоивших настоящую методику измерений

## 8 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

температура воздуха	(20 ± 10) °С,
атмосферное давление	от 630 до 800 мм. рт. ст.,
относительная влажность воздуха	от 20 % до 85 %.

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



## 9 Отбор и хранение проб

Отбор и хранение проб проводят в соответствии с правилами установленными внутренними документами лаборатории, а также ГОСТ 7631 и ГОСТ 31339.

## 10 Подготовка к выполнению измерений

Подготовку средств измерений к работе осуществляют в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора.

### 10.1 Приготовление растворов

#### 10.1.1 Приготовление рабочих растворов

##### *Раствор уксусной кислоты 1 %*

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см<sup>3</sup> вносят 0,5 см<sup>3</sup> уксусной кислоты, с помощью цилиндра приливают 49,5 см<sup>3</sup> деионизованной воды и перемешивают. Раствор хранится в течение недели при комнатной температуре.

##### *Раствор уксусной кислоты 1 % в ацетонитриле*

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см<sup>3</sup> вносят 0,5 см<sup>3</sup> уксусной кислоты, с помощью цилиндра приливают 49,5 см<sup>3</sup> ацетонитрила и перемешивают. Раствор хранится в течение месяца при комнатной температуре.

#### 10.1.2 Приготовление подвижной фазы

##### *Подвижная фаза «А»*

На весах (4.1.3), взвешивают 0,38 г ацетата аммония (4.3.3), переносят в стеклянную бутылку вместимостью 1000 см<sup>3</sup> с помощью мерного цилиндра и дозатора переменного объёма приливают 990 см<sup>3</sup> и 8,6 см<sup>3</sup> деионизованной воды. С помощью дозатора переменного объёма вносят 1 см<sup>3</sup> муравьиной кислоты (4.3.2). Полученный раствор перемешивают. Раствор хранится в течение двух месяцев при комнатной температуре.

##### *Подвижная фаза «Б»*

С помощью дозатора переменного объёма вносят 1 см<sup>3</sup> муравьиной кислоты (4.3.2) в стеклянную бутылку вместимостью 1000 см<sup>3</sup>. С помощью мерного цилиндра в ту же бутылку вносят 999 см<sup>3</sup> ацетонитрила (4.3.1) и перемешивают. Раствор хранится в течение двух месяцев при комнатной температуре.

#### 10.1.3 Приготовление рабочих растворов

При приготовлении рабочих растворов красителей (С) и растворов их внутренних стандартов (D) рассчитывают навеску, эквивалентную 5,0 мг основного ве-

щества, для каждого определяемого соединения исходя из массовой доли в исходном веществе по формуле (1).

$$m = 5 \cdot \frac{M_0}{M} \cdot \frac{100}{c}, \quad (1)$$

где  $M_0$  – молярная масса соли анализируемого соединения (для анализируемых соединений, растворы которых приготавливаются из солей), г/моль;

$M$  – молярная масса анализируемого соединения, г/моль;

$C$  – массовая доля анализируемого соединения (или его соли) в исходном веществе, %.

### **10.1.3.1 Приготовление исходных растворов ( $C_0$ ) красителей с массовыми концентрациями 500 мкг/см<sup>3</sup>**

Навески, эквивалентные 5,0 мг основных веществ определяемых соединений, взвешивают на весах (4.1.2) и переносят в индивидуальные мерные колбы вместимостью 10 см<sup>3</sup>. Доводят объемы растворов до метки метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню. Лейко- метаболиты красителей растворяют в ацетоне. Метиленовый синий и 9-аминоакридин растворяют в растворе метанол/вода в соотношении 1:1. Приготовленные растворы хранят в холодильной камере в полипропиленовых пробирках с завинчивающимися крышками при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 1 года.

### **10.1.3.2 Приготовление рабочего раствора ( $C_1$ ) красителей с массовой концентрацией 5 мкг/см<sup>3</sup>, 9-аминоакридина с акрифлавином 20 мкг/см<sup>3</sup> и парарозанилина основания с массовой концентрацией 10 мкг/см<sup>3</sup>**

С помощью одноканального дозатора переменного объема отбирают 0,2 см<sup>3</sup> раствора парарозанилина основания  $C_0$  и переносят в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>. В ту же колбу, добавляют по 0,4 см<sup>3</sup> индивидуальных растворов 9-аминоакридина и акрифлавина  $C_0$ . Далее, с помощью одноканального дозатора переменного объема отбирают по 0,1 см<sup>3</sup> оставшихся индивидуальных растворов красителей  $C_0$  и переносят в общую колбу на 10 см<sup>3</sup>. Доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают. Приготовленный раствор хранят в холодильной камере перелитым в полипропиленовый флакон с завинчивающейся крышкой при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 1 года.

### **10.1.3.3 Приготовление рабочего раствора ( $C_2$ ) красителей с массовой концентрацией 50 нг/см<sup>3</sup>, 9-аминоакридина с акрифлавином 200 нг/см<sup>3</sup> и парарозанилина основания с массовой концентрацией 100 нг/см<sup>3</sup>**

С помощью одноканального дозатора переменного объема отбирают 0,1 см<sup>3</sup> рабочего раствора  $C_1$  и переносят в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>. Доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают. Приготовленный раствор хранят в холодильной камере перелитым в полипропиленовый флакон с завинчивающейся крышкой при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 6 месяцев.

#### **10.1.3.4 Приготовление исходных растворов ( $D_0$ ) внутренних стандартов с массовой концентрацией 500 мкг/см<sup>3</sup>**

Взвешивают 0,0050 г внутренних стандартов красителей и вносят в мерные колбы вместимостью 10 см<sup>3</sup>. Доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню. Внутренние стандарты лейко- метаболитов растворяют в ацетоне. Приготовленный раствор хранят в холодильной камере, в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 1 года.

#### **10.1.3.5 Приготовление рабочего раствора ( $D_1$ ) внутреннего стандарта с массовой концентрацией малахитового зеленого – $D_5$ и кристаллического фиолетового – $D_6$ 5 мкг/см<sup>3</sup>, лейко- метаболитов 10 мкг/см<sup>3</sup>**

С помощью одноканального дозатора переменного объема отбирают по 0,1 см<sup>3</sup> растворов  $D_0$  малахитового зеленого и кристаллического фиолетового, переносят в мерную колбу, объемом 10 см<sup>3</sup>. С помощью одноканального дозатора переменного объема отбирают по 0,2 см<sup>3</sup> растворов  $D_0$  лейко- метаболитов и переносят в ту же мерную колбу, объемом 10 см<sup>3</sup>. Доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают. Приготовленный раствор хранят в холодильной камере в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 1 года.

#### **10.1.3.6 Приготовление рабочего раствора ( $D_2$ ) внутреннего стандарта с массовой концентрацией малахитового зеленого – $D_5$ и кристаллического фиолетового – $D_6$ 0,1 мкг/см<sup>3</sup>, лейко- метаболитов 0,2 мкг/см<sup>3</sup>**

С помощью одноканального дозатора переменного объема отбирают 0,2 см<sup>3</sup> раствора  $D_1$  и переносят в мерную колбу, объемом 10 см<sup>3</sup>. Доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают. Приготовленный раствор хранят в холодильной камере в полипропиленовой пробирке с завинчивающейся крышкой при температуре от 0 °С до 5 °С в течение 6 месяцев.

### **10.1.4 Приготовление градуировочных растворов красителей ( $G_1 - G_6$ )**

#### **10.1.4.1 Приготовление градуировочных растворов ( $G_1 - G_6$ ) продукции аквакультуры**

С помощью одноканальных дозаторов переменного объема к навеске образца ( $1,0 \pm 0,05$  г.) в полипропиленовой пробирке объемом 15 см<sup>3</sup> – образцу заведомо не содержащему определяемые компоненты (бланку), добавляют рабочий раствор  $C_2$  красителей и раствор внутреннего стандарта  $D_2$ , в соответствии с таблицей 2. Затем проводят полный цикл пробоподготовки в соответствии с разделом 10.4.

Таблица 2 – Приготовление градуировочных растворов.

Название образца, концентрация, мкг/кг	Рабочий раствор C <sub>2</sub> , мм <sup>3</sup>	Рабочий раствор D <sub>2</sub> , мм <sup>3</sup>
Бланк (0,0)	–	50
G <sub>1</sub> (0,25/0,5/1,0)	5	
G <sub>2</sub> (0,5/1,0/2,0)	10	
G <sub>3</sub> (1,0/2,0/4,0)	20	
G <sub>4</sub> (2,0/4,0/8,0)	40	
G <sub>5</sub> (5,0/10,0/20,0)	100	
G <sub>6</sub> (10,0/20,0/40,0)	200	

## 10.2 Подготовка прибора к измерениям

Подготовку хроматографа к работе осуществляют в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора.

### 10.2.1 Параметры настройки жидкостного хроматографа

температура колонки 30 °С;

объем вводимой пробы 10 мм<sup>3</sup>;

температура в отсеке устройства ввода проб (10-20) °С.

Таблица 3 – Условия хроматографического разделения.

Время, мин	Подвижная фаза «А», %	Подвижная фаза «Б», %	Скорость потока, см <sup>3</sup> /мин
0	95	5	0,35
2	95	5	0,35
2.1	40	60	0,35
4	2	98	0,35
6.5	2	98	0,35
6.6	95	5	0,35
9.6	95	5	0,35

### 10.2.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

- Режим ионизации – положительный;
- Режим сканирования – MRM;
- Скорость сканирования – 25 мкс.;
- Температура источника (TEM) – 500 °С;
- Напряжение ионного источника (IS) – 4500 В;
- Газ завеса (CUR) – 25;
- Газ источника (GS1/GS2) – 60/60;
- Газ соударения (CAD) – medium;
- Потенциал входа (EP) – 10 В;
- Потенциал выхода (CXP) – 4 В.

Таблица 4 – Параметры работы.

№	Наименование соединения	Ион Предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	DP, В	CE, В	RT, мин.	Соответствие IS
1	ACR 182	224,1	*182,3	150	46	2,86	-
2	ACR 209	224,1	209,3	150	37		-
3	9-AMA 151	195,2	*151,3	195	46	2,85	-
4	9-AMA 178	195,2	178,1	195	40		-
5	AZA 214	256,1	*214,1	150	43	2,87	-
6	AZA 241	256,1	241,2	150	36		-
7	AZB 228	270,2	*228,1	150	44	2,86	-
8	AZB 254	270,2	254,2	150	45		-
9	BG 297	385,3	297,2	66	50	3,44	CV-D6 362
10	BG 341	385,3	*341,2	66	50		CV-D6 362
11	CV 340	372,3	340,2	76	50	3,27	CV-D6 362
12	CV 356	372,3	*356,2	76	50		CV-D6 362
13	CV-D6 362	378,3	362,3	76	50		-
14	EV 369	457,1	369,4	120	75	3,99	-
15	EV 413	457,1	413,3	120	57		-
16	LCV 238	374,2	238,5	198	35	4,01	LCV-D6 242
17	LCV 359	374,2	*359,4	198	30		LCV-D6 242
18	LCV-D6 242	380,2	242,3	200	46		-
19	LMG 239	331,5	*239,2	140	30	4,22	LMG-D5 240
20	LMG 316	331,5	316,2	140	29		LMG-D5 240
21	LMG-D5 240	336,5	240,3	160	44		-
22	MB 240	284,0	240,2	150	44	2,87	-
23	MB 268	284,0	268,1	150	47		-
24	MG 284	329,2	284,2	66	50	3,09	MG-D5 318
25	MG 313	329,2	*313,2	66	50		MG-D5 318
26	MG-D5 318	334,3	318,2	66	50		-
27	PB 168	288,1	168,1	150	51	2,86	-
28	PB 195	288,1	195,2	150	43		-
29	VBB 349	470,1	349,3	140	51	3,45	-
30	VBB 454	470,1	*454,3	140	57		-
31	VBO 329	478,3	329,3	120	50	3,81	-
32	VBO 434	478,3	434,4	120	57		-
33	VBR 301	422,1	301,2	140	45	3,35	-
34	VBR 393	422,1	393,3	140	50		-

\* – рекомендуется использовать для количественного анализа

Контроль чувствительности хроматографа с масс-спектрометрическим детектором осуществляют введением 10 мм<sup>3</sup> градуировочного раствора G<sub>2</sub> в инжектор хроматографа с помощью автоматического устройства ввода проб. Полученное значение соотношения сигнал/шум для любого определяемого вещества, используемого для количественного анализа, должно быть не менее 10. Подвижную фазу, реагенты и матрицу проверяют на наличие красителей или других соединений, мешающих определению.

### 10.3 Установление градуировочной характеристики

Градуировочную зависимость строят каждый раз перед новой серией измерений.

Процедура приготовления градуировочных растворов описана в разделе 10.1.4. После добавления рабочих растворов в количестве, необходимом для получения массовых концентраций в необходимом диапазоне и раствора внутреннего стандарта, проводят обработку согласно разделу 10.4.

В инжектор хроматографа, последовательно вводят по 10 мм<sup>3</sup> градуировочных растворов. Относительные времена удерживания определяемых соединений приведены в таблице 4.

Градуировочную зависимость строят в автоматическом режиме в координатах «отношение площади пика определяемого соединения к площади пика внутреннего стандарта» – «массовая концентрация определяемого соединения в градуировочном растворе». При построении градуировочной зависимости используют линейную регрессию, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98. Допустимо применение ручной обработки хроматограмм.

### 10.4 Подготовка проб

Образцы взвешивают на весах (4.1.3) по (1,0±0,05) г и помещают в полипропиленовую пробирку (4.2.8) вместимостью 15 см<sup>3</sup>. С помощью одноканального дозатора переменного объёма (4.1.4) в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> и встряхивают на шейкере, примерно 3 с (4.2.2). В ту же пробирку, вносят 1 см<sup>3</sup> раствора 1 % уксусной кислоты (10.1.1.1) и встряхивают на шейкере (4.2.2) до кашеобразного состояния, примерно 5 с. Далее, в пробирку вносят 5 см<sup>3</sup> раствора 10.1.1.2, закрывают крышкой и устанавливают на 15-минутную экстракцию в вертикальный шейкер (4.2.1) при 4-й скорости. После экстракции, пробирку снимают с шейкера и вносят в неё (3±0,05) г натрия сульфата, предотвращая попадание натрия сульфата на кромку пробирки. Пробирку закрывают и однократно встряхивают, после чего устанавливают на 10-минутную экстракцию в вертикальный шейкер (4.2.1) при 4-й скорости. Пробирку с содержимым устанавливают в центрифугу и центрифугируют при 4750 об/мин и 20 °С, в течение 10 минут. Одноканальным дозатором переменного объёма отбирают 4 см<sup>3</sup> жидкости, полученной при центрифугировании, и переносят в новую пробирку вместимостью 15 см<sup>3</sup>, содержащую (2±0,05) г смеси магния сульфата и натрия ацетата (4.3.6). Проверяют отсутствие данных солей на кромке пробирки, закрывают крышкой и трясут до насыщения навески солей (примерно 10-15 секунд). Центрифугируют пробирку с содержимым при 4750 об/мин и 20 °С, в течение 15 минут. Одноканальным дозатором переменного объёма отбирают 1 см<sup>3</sup> жидкости, полученной при центрифугировании, и переносят в пробирку из набора 3.3.7, содержащую 50 мг PSA, 50 мг C18, 150 мг магния сульфата, или в пробирку микроцентрифужную (4.2.12), содержащий навески перечисленных ком-



понентов. Плотнo закрывают и устанавливают для экстракции в шейкер 3.2.3, на 5 минут при максимальной скорости. Центрифугируют пробирку с содержимым при 500 об/мин (при 10000 об/мин в случае использования пробирки микроцентрифужной, на соответствующей центрифуге) и 20 °С, в течение 10 минут. Одноканальным дозатором переменного объёма отбирают и переносят полученную жидкость в пробирку для автоматического устройства ввода проб (4.2.11) и используют для анализа. При необходимости, полученную жидкость можно отфильтровать с помощью насадочного фильтра (4.2.13-4.2.14).

Примечание: При анализе образцов, содержащих массовые концентрации анализируемых веществ выше верхнего предела количественного определения, допускается разведение конечной пробы раствором по п. 10.1.1.2, но не более чем в 10 раз.

## 11 Выполнение измерений

При выполнении измерений в инжектор хроматографа вводят подготовленную по п. 10.4 пробу. С помощью установленных градуировочных характеристик проводят количественное определение красителей в анализируемом растворе.

При количественном определении красителей, рассчитывают отношения площадей пиков ионов-продуктов в анализируемом растворе и сравнивают их с отношениями площадей пиков ионов-продуктов в градуировочных растворах, отклонения не должны превышать значений, указанных в таблице 5.

Таблица 5 – Допустимые отклонения относительных ионных интенсивностей.

Отношение площадей пиков ионов-продуктов (% от основного пика)	Максимально допустимые отклонения для ВЭЖХ-МС/МС детектирования
> 50 %	± 20 %
> 20 % до 50 %	± 25 %
> 10 % до 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

Отношение площадей пиков ионов-продуктов рассчитывают по формуле (2)

$$\frac{A1(an)}{A2(an)}, \quad (2)$$

где A1(an) – площадь пика определяемого соединения для иона-продукта с меньшей интенсивностью;

A2(an) – площадь пика определяемого соединения для иона-продукта с наибольшей интенсивностью.

Для каждого положительного образца, проводят два параллельных измерения.

## 12 Обработка результатов измерений



Результаты измерений обрабатывают с помощью программы Analyst и выдают результат в виде массовой доли анализируемого вещества.

За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (3)

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r, \quad (3)$$

где  $X_1, X_2$  – результаты параллельных определений массовой доли, мкг/кг,  
 $r$  – значение предела повторяемости, % (таблица 1)

Если условие (3) 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 (4)

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

где  $X_{\max}, X_{\min}$  – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой доли, 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  $n = 4$

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r \quad (5)$$

где  $\sigma_r$  – показатель повторяемости, % ( $\sigma_r = 10\%$ ).

Если условие (4) 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:

$$\bar{X}_{k,c} \pm 0,01 \cdot U_{k,c} \cdot \bar{X}_{k,c}, \text{ при } k=2,$$

где  $\bar{X}_{k,c}$  – среднее арифметическое значение результатов  $n$  определений массовой доли, признанных приемлемыми по 11.1, 11.2, мкг/кг;

$U_{k,c}$  – значение относительной расширенной неопределенности, % (таблица 1).

В случае если содержание массовой доли, ниже нижней (в т.ч. сигнал отсутствует) (выше верхней) границы диапазона измерений, производят следующую запись в журнале: «массовая доля – менее «X» мкг/кг (более «X» мкг/кг)», где «X» есть предел количественного определения.

## **14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории**

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории осуществляют 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. Проверку стабильности рекомендуется осуществлять с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля результатов измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

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.