

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
ФГБУ «ВГНКИ»**

УТВЕРЖДЕНО
Заместитель директора ФГБУ «ВГНКИ»

_____ А.В. Третьяков

« 14 » _____ 04 _____ 2023 г.

на основании доверенности от 08.07.2022 № 35



**Методические указания по определению
остаточного содержания метаболитов нитрофуранов в
продукции животноводства методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-
спектрометрическим детектированием.
МУ А-1/104**

Москва 2022

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) 253-14-91; E-mail: vgnki@fsvps.gov.ru

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 № РОСС.RU.0001.310354-0096/2023 от 14.04.2023 г.

Регистрационный номер методики измерений в Федеральном реестре:
ФР.1.31.2023.45846

—

СОДЕРЖАНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	5
3 ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ.....	8
4 ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНОМУ ОБОРУДОВАНИЮ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ.....	13
4.1 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ	13
4.2 ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ	13
4.3 РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ	14
5 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ.....	17
6 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ, ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	17
7 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ	17
8 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ИЗМЕРЕНИЙ	17
9 ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.....	18
10 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ	18
10.1 Подготовка лабораторной посуды.....	18
10.2 Приготовление растворов.....	18
10.4 УСТАНОВЛЕНИЕ ГРАДУИРОВОЧНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ	26
10.5 Подготовка проб	26
11 ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ	26
12 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	28
13 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	29
15 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИКИ В ЛАБОРАТОРИИ	32
ПРИЛОЖЕНИЕ А	33
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	34

Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли метаболитов нитрофуранов АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДСГ в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и предназначен для организаций и учреждений, независимо от их организационно-правовой формы, осуществляющих контроль безопасности пищевой продукции, а также мониторинг продукции животноводства по остаточному содержанию лекарственных средств.

Диапазон измерений массовой доли метаболитов нитрофуранов в продукции животноводства составляет от 0,3 до 100 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 29245 Консервы Молочные Методы определения физических и органолептических показателей.

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 12.0.004-2015 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения.

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

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

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

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

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

ГОСТ 2768-84 Ацетон технический. Технические условия.

ГОСТ 4220-75 Калий двухромовокислый. Технические условия.

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. 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 31339-2006 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб.

ГОСТ 19792-2017 Мед натуральный. Технические условия.

ГОСТ 33791-2016 Кишки и мочевые пузыри свиные. Технические условия.

ГОСТ 33790-2016 Кишки и мочевые пузыри говяжьи. Технические условия.

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

ГОСТ 28311-21 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.

ГОСТ Р 52501-2005 (ИСО 3696:1987). Вода для лабораторного анализа.

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

Примечание¹

¹ При использовании 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 использовании настоящим документом на методику измерений следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Требования к показателям точности измерения

Диапазон измерений массовой доли АОЗ, АМОЗ, СЕМ в продукции животноводства (мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки, молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты) от 0,3 до 100 мкг/кг, в кишках и кишечном сырье – от 0,3 до 50 мкг/кг. Диапазон измерений массовой доли АГД в продукции животноводства (мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки, молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты) от 0,5 до 100 мкг/кг, в кишках и кишечном сырье - от 0,5 до 50 мкг/кг. Диапазон измерений массовой доли ДСГ в продукции животноводства (мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки, молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты) от 0,3 до 10 мкг/кг, в кишках и кишечном сырье от 0,5 до 10 мкг/кг.

Приписанные характеристики показателей точности результатов измерений массовой концентрации АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ, ДСГ в образцах продукции животноводства приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Показатели точности методики (значения относительной расширенной неопределенности результатов измерений, относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости).

Объект	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности*, $\pm U$, % при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости и, г, % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
АОЗ					
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки	От 0,3 до 2,0 вкл.	28	8	13	23
	От 2,0 до 5,0 вкл.	24	7	11	20
	От 5,0 до 10,0 вкл.	22	7	10	19
	От 10,0 до 50,0 вкл.	20	6	9	16
	Св. 50 до 100 вкл.	19	5	9	13
Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,3 до 2,0 вкл.	28	10	13	28
	От 2,0 до 5,0 вкл.	24	8	11	23
	От 5,0 до 10,0 вкл.	21	7	10	20

	От 10,0 до 50,0 вкл.	17	6	8	16
	Св. 50 до 100 вкл.	15	5	7	13
Кишки и кишечное сырье	От 0,3 до 2,0 вкл.	18	8	8	22
	От 2,0 до 5,0 вкл.	15	7	6	18
	От 5,0 до 10,0 вкл.	13	6	5	17
	От 10,0 до 50,0 вкл.	10	5	4	14
АМОЗ					
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки	От 0,3 до 2,0 вкл.	29	11	13	30
	От 2,0 до 5,0 вкл.	24	10	11	27
	От 5,0 до 10,0 вкл.	22	9	10	25
	От 10,0 до 50,0 вкл.	18	8	8	21
	Св. 50 до 100 вкл.	16	7	7	20
Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,3 до 2,0 вкл.	26	10	12	29
	От 2,0 до 5,0 вкл.	22	9	10	25
	От 5,0 до 10,0 вкл.	20	8	9	23
	От 10,0 до 50,0 вкл.	16	7	7	20
	Св. 50 до 100 вкл.	14	7	6	18
Кишки и кишечное сырье	От 0,3 до 2,0 вкл.	18	12	7	33
	От 2,0 до 5,0 вкл.	15	9	6	26
	От 5,0 до 10,0 вкл.	14	6	6	17
	От 10,0 до 50,0 вкл.	11	2	5	6
АГД					
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и	От 0,5 до 2,0 вкл.	34	14	22	39

продукты из мяса птицы, креветки, раки	От 2,0 до 5,0 вкл.	29	9	13	25
	От 5,0 до 10,0 вкл.	26	7	10	21
	От 10,0 до 50,0 вкл.	22	6	9	18
	Св. 50 до 100 вкл.	19	6	8	17
Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,5 до 2,0 вкл.	35	11	17	30
	От 2,0 до 5,0 вкл.	31	9	14	25
	От 5,0 до 10,0 вкл.	29	8	13	22
	От 10,0 до 50,0 вкл.	24	6	10	18
	Св. 50 до 100 вкл.	22	5	9	15
Кишки и кишечное сырье	От 0,5 до 2,0 вкл.	20	13	19	37
	От 2,0 до 5,0 вкл.	18	9	12	24
	От 5,0 до 10,0 вкл.	16	6	8	17
	От 10,0 до 50,0 вкл.	14	5	6	14
СЕМ ²					
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки	От 0,3 до 2,0 вкл.	34	10	16	29
	От 2,0 до 5,0 вкл.	33	10	16	27
	От 5,0 до 10,0 вкл.	22	8	11	21
	От 10,0 до 50,0 вкл.	19	6	9	18
	Св. 50 до 100 вкл.	19	6	8	16

² Эндогенное присутствие семикарбазида в раках не позволяет провести валидационные исследования и получить удовлетворительные метрологические характеристики. Допускается выдавать результаты по семикарбазиду в раках, при условии, что применение нитрофуразона установлено законными процедурами. При выдаче результатов следует использовать метрологические характеристики для типа матриц: мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки

Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,3 до 2,0 вкл.	33	17	16	46
	От 2,0 до 5,0 вкл.	29	10	14	27
	От 5,0 до 10,0 вкл.	26	8	12	22
	От 10,0 до 50,0 вкл.	22	7	10	19
	Св. 50 до 100 вкл.	19	6	9	18
Кишки и кишечное сырье	От 0,3 до 2,0 вкл.	19	6	10	16
	От 2,0 до 5,0 вкл.	15	5	7	14
	От 5,0 до 10,0 вкл.	14	5	6	13
	От 10,0 до 50,0 вкл.	13	4	5	11
ДСГ					
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, молоко и молочные продукты	от 0,3 до 0,5 вкл.	31	10	14	28
	от 0,5 до 1,0 вкл.	25	9	12	24
	от 1,0 до 2,0 вкл.	23	7	11	20
	от 2,0 до 5,0 вкл.	21	6	10	16
	от 5,0 до 10,0 вкл.	20	5	10	13
Креветки, раки, яйца, яичный порошок, мёд	от 0,3 до 0,5 вкл.	35	11	17	30
	от 0,5 до 1,0 вкл.	30	8	14	21
	от 1,0 до 2,0 вкл.	26	6	12	17
	от 2,0 до 5,0 вкл.	21	5	10	14

	от 5,0 до 10,0 вкл.	17	5	8	13
Кишки и кишечное сырье	от 0,5 до 1,0 вкл.	25	10	11	27
	от 1,0 до 2,0 вкл.	24	10	11	26
	от 2,0 до 5,0 вкл.	24	9	11	26
	от 5,0 до 10,0 вкл.	23	9	10	26
* - 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

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 (AB SCIEX, Канада, США).

4.1.2 Система высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до (40 ± 10) °С.

4.1.3 Колонка хроматографическая, обращено-фазная C18, 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: 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 мерные 2–10 (100, 1000)–1 по ГОСТ 1770.

4.1.8 Дозаторы механические автоматические переменного объёма (2 – 20) мм³, (10 - 100) мм³, (100 – 1000) мм³, (500 – 5000) мм³ 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 объёмом 15,0 см³, 50,0 см³ с завинчивающимися крышками.

4.2.3 Виалы (флаконы) стеклянные объемом 2,0 см³ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 диаметром мм.

4.2.4 Шейкер-вортекс.

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, совместимая с пластиковыми пробирками объемами 15 см³, 50,0 см³, с максимальной скоростью вращения не менее 3000 об/мин.

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

4.2.8 Картриджи для твердофазной экстракции объемом не менее 10 см³, заполненные сорбентом силикагель, с частицами диаметром не более 60 мкм, массой 500 мг.

4.2.9 Встряхиватель (шейкер) вибрационный или переворачивающий с минимальной скоростью работы 1000 об/мин.

4.2.10 Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

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 см³, медицинские.

4.2.17 Шкаф термостатируемый с рабочим диапазоном температур, включающим 37 °С.

4.2.18 Бумага индикаторная универсальная с рабочим диапазоном pH, включающим pH 3-9.

4.2.19 Фарфоровый стакан объемом 1,5 дм³.

4.3 Реактивы и материалы

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

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

4.3.3 Кислота серная «х.ч.».

4.3.4 Гексан, квалификация «х.ч.», CAS № 110-54-3.

4.3.5 Метанол, квалификация «х.ч.».

4.3.6 2-нитробензальдегид, квалификация «х.ч.»

4.3.7 Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144

4.3.8 Калий двухромовокислый «х.ч.» по ГОСТ 4220.

4.3.9 Вода второй степени чистоты по ГОСТ Р 52501.

4.3.10 Кислота соляная, квалификация «х.ч.».

4.3.11 Натрия фосфат, квалификация «х.ч.».

4.3.12 Натрия гидроксид, квалификация «х.ч.».

4.3.13 Этилацетат, квалификация «х.ч.».

4.3.14 Формиат аммония, квалификация «х.ч.».

4.3.15 Дихлорметан, квалификация «х.ч.».

4.3.16 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 80-65-

9

4.3.17 3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (АМОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 43056-63-9

4.3.18 1-аминогидантоин (АГД) гидрохлорид, доля основного вещества не менее 90%, CAS 2827-56-7

4.3.19 семикарбазид (СЕМ) гидрохлорид, доля основного вещества не менее 90%, CAS 563-41-7

4.3.20 3,5-динитросалициловой кислоты гидразид (ДСГ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 955-07-7

4.3.21 d4-3-амино-2-оксазолидинон (d4-АОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 1188331-23-8

4.3.22 d5-3-амино-5-метилморфолино-2-оксазолидинон (d5-АМОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 1017793-94-0

4.3.23 1,2-N15, C13- семикарбазид (1,2-N15, C13-СЕМ) гидрохлорид, доля основного вещества не менее 90%, CAS 1173020-16-0

4.3.24 (C13)3-1-аминогидантоин ((C13)3-АГД), доля основного вещества не менее 90%, CAS 957509-31-8

4.3.25 Диметилсульфоксид «х.ч.» (ДМСО).

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.

Примечание 3 – в качестве внутреннего стандарта для ДСГ допускается применение изотопномеченных аналогов ДСГ.

Примечание 4 – при настройке оптимальных параметров работы масс-спектрометрического детектора допускается применять коммерчески доступные нитрофенильные производные метаболитов нитрофуранов и их изотопных аналогов:

3-[(2-нитрофенил) метилен]-амино-2-оксазолидинон (НФ-АОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 19687-73-1;

5-метилморфолино-3-[(2-нитрофенил) метилен]-3-амино-2-оксазолидинон (НФ-АМОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 183193-59-1;

1-[(2-нитрофенил) метилен]-аминогидантоин (НФ-АГД), доля основного вещества не менее 90%, CAS 623145-57-3

2-нитрофенил) метилен-семикарбазид (НФ-СЕМ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 16004-43-6;

d4-3-[(2-нитрофенил) метилен]-амино-2-оксазолидинон (НФ-d4-АОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 1007478-57-0

d5-5-метилморфолино-3-[(2-нитрофенил) метилен]-3-амино-2-оксазолидинон (НФ-d5-АМОЗ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 1173097-59-0

(C13)31-[(2-нитрофенил) метилен]-амино-гидантоин (НФ-(C13)3-АГД), доля основного вещества не менее 90%, CAS 1007476-86-9

1,2-N15, C13-(2-нитрофенил) метилен-семикарбазид (НФ-1,2-N15,C13-СЕМ), доля основного вещества не менее 90%, CAS 1173020-16-0.

5 Метод измерений

Измерение массовой доли метаболитов нитрофуранов выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Пробу, прошедшую кислотный гидролиз и дериватизацию, подвергают очистке жидкость-жидкостной экстракцией. Детектирование дериватизированных производных метаболитов нитрофуранов проводят в режиме мониторинга выбранных реакций (*MRM*) в положительной и 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 «Правила промышленной безопасности при использовании оборудования, работающего под избыточным давлением» утвержденные приказом Федеральной службы по экологическому, технологическому и атомному надзору от 15.12.2020 №536, 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 при 25 °С	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 31339, ГОСТ 19792, ГОСТ 33791, ГОСТ 33790 и иные документы, регламентирующие порядок проведения (технологии) отбора проб указанных объектов исследований (испытаний).

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 растворе калия двуххромовокислого 3 %. 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±0,1) г калия двуххромовокислого (4.3.8) переносят в фарфоровый стакан объёмом 1,5 дм³, добавляют с помощью мерного цилиндра 100 см³ дистиллированной воды (4.3.7) 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 дм³ концентрированной серной кислоты (4.3.3). После остывания приготовленный раствор осторожно переливают в

толстостенную бутылку с завинчивающейся крышкой. Раствор пригоден к работе до появления зеленой окраски.

10.2.2 Приготовление подвижных фаз А и Б

Приготовление подвижной фазы А

В стеклянную бутылку объемом 1000 см³ (4.2.1) мерным цилиндром (4.1.9) отмеряют 995 см³ деионизированной воды (4.3.9) и добавляют 5,0 см³ муравьиной кислоты (4.3.2), 2,0 г формиата аммония (4.3.14). Перемешивают до растворения. Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.2.7) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

Приготовление подвижной фазы Б

В стеклянную бутылку объемом 1000 см³ (4.2.1.) мерным цилиндром (4.1.9) отмеряют 900 см³ ацетонитрила (4.3.1), 2,5 см³ муравьиной кислоты (4.3.2), 100 см³ деионизированной воды (4.3.9), 2,0 г формиата аммония, (4.3.14). Перемешивают до растворения. Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.2.7) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.3 Приготовление раствора соляной кислоты с молярной концентрацией 0,2 моль/дм³

В мерную колбу объемом 1000 см³ (4.1.7) добавляют 17,4 см³ соляной кислоты (4.3.10) и доводят до метки дистиллированной водой (4.3.7).

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.4 Приготовление раствора гидроксида натрия с молярной концентрацией 4 моль/дм³

В мерную колбу объемом 1000 см³ (4.1.7) вносят 160 г гидроксида натрия (4.3.12) и доводят до метки дистиллированной водой (4.3.7).

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц.

10.2.5 Приготовление раствора НБА.

В мерную колбу 10 см³ (4.1.7) вносят 151 мг 2-нитробензальдегида (4.3.6) и доводят до метки метанолом (4.3.5).

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 неделя.

10.2.6 Приготовление раствора фосфата натрия с молярной концентрацией 0,3 моль/дм³

В мерную колбу объемом 100 см³ (4.1.7) вносят 11,4 г фосфата натрия додекагидрата (4.3.11) и доводят до метки дистиллированной водой (4.3.7).

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 6 месяцев.

10.2.7 Приготовление 0,5% раствора муравьиной кислоты

В мерную колбу объёмом 100 см³ вносят 0,5 см³ муравьиной кислоты (4.3.2) и доводят до метки деионизированной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 1 месяц

10.2.8 Приготовление раствора для анализа ВЭЖХ-МС/МС

Смешивают 50 см³ деионизированной воды (4.3.9) и 50 см³ 0,5% раствора муравьиной кислоты (10.2.7).

10.2.9 Приготовление раствора ДМСО 30% в метаноле

В мерную колбу объёмом (4.1.7) 100 см³ вносят 30,0 см³ диметилсульфоксида (4.3.25) и доводят до метки метанолом (4.3.5)

10.2.10 Приготовление рабочих растворов стандартных образцов

При взвешивании стандартных образцов следует рассчитывать массу навески в пересчете на чистое вещество, согласно формуле 1:

$$m_c = M_c \cdot m \cdot 100 / M \cdot P_a \quad (1)$$

m_c – масса навески используемого стандартного образца;

M_c – молярная масса используемого стандартного образца;

m – масса навески чистого стандартного образца;

M – молярная масса чистого стандартного образца;

P_a – степень чистоты используемого стандартного образца.

10.2.10.1 Приготовление исходного раствора (C_0) 1,0 мг/см³ АОЗ, АМОЗ, СЕМ, АГД.

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0-12,0 мг (в пересчете на чистое вещество по формуле 1) каждого стандартного образца АОЗ, АМОЗ, АГД, СЕМ и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см³, добавляют метанол (4.3.5). из расчета 1 см³ раствора на 1 мг стандартного образца, помещают в ультразвуковую баню на 1 мин, перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °С – 12 месяцев.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объёмом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.10.2 Приготовление исходного раствора (C_0) 1,0 мг/см³ ДСГ

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0-12,0 мг (в пересчете на чистое вещество по формуле 1) ДСГ и переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³, добавляют 30% раствор ДМСО (10.2.9) из расчета 1 см³ раствора на 1 мг стандартного образца, помещают в ультразвуковую баню на 1 мин, перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20°C – 12 месяцев.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.10.3 Приготовление раствора (C_1) с массовой концентрацией 10 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 0,1 см³ каждого раствора C_0 (10.2.10.1, 10.2.10.2) в мерную колбу объемом 10,0 см³, доводят до метки метанолом (4.3.5), перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °C – 12 месяцев.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.10.4 Приготовление раствора (C_2) с массовой концентрацией аналита в растворе 1 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C_1 (10.2.10.3) в мерную колбу объемом 10,0 см³, доводят до метки метанолом (4.3.5), перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °C – 1 месяц.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.10.5 Приготовление раствора (C_3) с массовой концентрацией аналита в растворе 0,1 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C_2 (10.2.10.4) в мерную колбу объемом 10,0 см³, доводят до метки метанолом (4.3.5), перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °C – 1 месяц.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.10.6 Приготовление раствора (C_4) с массовой концентрацией аналита в растворе 0,01 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора С₃ (10.2.10.5) в мерную колбу объемом 10,0 см³, доводят до метки метанолом (4.3.5), перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °С – 1 месяц.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.10.7. Приготовление исходного раствора (D₀) 1,0 мг/см³ внутренних стандартов d₄-АОЗ, d₅-АМОЗ, (C¹³)₃-АГД, 1,2-N¹⁵, C¹³-СЕМ

На весах (4.1.5) взвешивают 8,0 – 12,0 мг (допускается проводить взвешивание без пересчета на чистое вещество) каждого внутреннего стандарта d₄-АОЗ, d₅-АМОЗ, (C¹³)₃-АГД, 1,2-N¹⁵, C¹³-СЕМ и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см³, добавляют метанол (4.3.5) из расчета 1 см³ раствора на 1 мг внутреннего стандарта, помещают в ультразвуковую баню на 1 мин, перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °С – 12 месяцев.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

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

Дозатором переменного объема отбирают по 0,1 см³ раствора D₀ (10.2.10.7) в мерную колбу объемом 10,0 см³, доводят до метки метанолом (4.3.5), перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °С – 12 месяцев.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.10.9. Приготовление раствора внутреннего стандарта (D₂) с массовой концентрацией аналита в растворе 1 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора D₁ (10.2.10.8) в мерную колбу объемом 10,0 см³, доводят до метки метанолом (4.3.5), перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре минус 20 °С – 1 месяц.

Допускается хранить в полипропиленовой пробирке объемом 15 см³ с винтовой крышкой (4.2.2).

10.2.11 Приготовление градуировочных растворов

10.2.11.1 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 0,3 мкг/кг (G1)

В пластиковую пробирку объемом 50,0 см³ (4.2.2) помещают 3,0 г образца, не содержащего метаболиты нитрофуранов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.10.9) и 0,09 см³ раствора C₄ (10.2.10.6), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.1.2.

10.2.11.2 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 0,5 мкг/кг (G2)

В пластиковую пробирку объемом 50,0 см³ (4.2.2) помещают 3,0 г образца, не содержащего метаболиты нитрофуранов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.10.9) и 0,15 см³ раствора C₄ (10.2.10.6), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.1.2.

10.2.11.3 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 1,0 мкг/кг (G3)

В пластиковую пробирку объемом 50,0 см³ помещают 3,0 г образца, не содержащего метаболиты нитрофуранов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.10.9) и 0,30 см³ раствора C₄ (10.2.10.6), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.1.2.

10.2.11.4 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 5,0 мкг/кг (G4)

В пластиковую пробирку объемом 50,0 см³ (4.2.2) помещают 3,0 г образца, не содержащего метаболиты нитрофуранов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.10.9) и 0,15 см³ раствора C₃ (10.2.10.5), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.1.2.

10.2.11.5 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 10,0 мкг/кг (G5)

В пластиковую пробирку объемом 50,0 см³ (4.2.2) помещают 3,0 г образца, не содержащего метаболиты нитрофуранов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.10.9) и 0,30 см³ раствора C₃ (10.2.10.5), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.1.2.

10.2.11.6 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 50,0 мкг/кг (G6)

В пластиковую пробирку объемом 50,0 см³ (4.2.2) помещают 3,0 г образца, не содержащего метаболиты нитрофуранов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.10.9) и 0,15 см³ раствора C₂ (10.2.10.4), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.1.2.

10.2.11.7 Приготовление градуировочного раствора с концентрацией аналита 100,0 мкг/кг (G7)

В пластиковую пробирку объемом 50,0 см³ (4.2.2) помещают 3,0 г образца, не содержащего метаболиты нитрофуранов (бланк). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,1 см³ раствора D₂ (10.2.10.9) и 0,30 см³ раствора C₂ (10.2.10.4), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту. Далее проводят подготовку проб согласно п. 10.5.1.2.

10.3 Подготовка прибора к измерениям

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

10.3.1 Рекомендуемые параметры настройки жидкостного хроматографа

температура колонки 40 °С;

скорость потока подвижной фазы 0,25 см³/мин.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования согласно таблице 2:

Таблица 2 - Хроматографические условия разделения

Время, мин.	Поток, см ³ /мин	Фаза А (об.%)	Фаза Б (об.%)
0,0	0,25	95	5
2,0	0,25	95	5
2,1	0,25	75	25
10,0	0,25	0	100
11,4	0,25	0	100
11,5	0,25	95	5
15	0,25	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 представлены в таблицах 3-5

Таблица 3 - Оптимизированные значения параметров источника ионизации

Температура источника (TEM):	500 °С
Напряжение на капилляре (IS):	4500 В
Разрешение Q1/Q3:	Unit
Значение вспомогательного газа (CUR):	25

Значение газа источника (GS1):	60
Значение распыляющего газа (GS2):	60
Значение газа ячейки коллизий (CAD):	Medium

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	НФ-ДСГ	374.000	226.000*	-100	-32/-20
			182.900	-100	-35/-15

* - рекомендуемый ион-продукт для проведения количественного определения

Таблица 5 - Параметры в положительном 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	НФ-АОЗ	236.100	134.100*	80	21/14
			104.100	80	31/14
2	НФ-АМОЗ	335.200	291.100*	80	17/38
			262.100	80	25/30
3	НФ-АГД	249.100	134.100*	50	18/16
			104.100	60	27/10
4	НФ-СЕМ	209.100	192.100*	85	15/20
			166.100	85	15/20
5	НФ-АОЗ-d4	240.100	134.100	141	23/10
6	НФ-АМОЗ-d5	340.300	296.100	116	17/28
7	НФ-АГД-3C ¹³	252.100	134.000	111	23/14
8	НФ-СЕМ-2N ¹⁵ ,C ¹³	212.100	195.100	120	17/14

Соотнесение анализируемого соединения и внутреннего стандарта представлено в таблице 6.

Таблица 6 - Соответствие анализируемого соединения и внутреннего стандарта

№	Определяемое вещество	Внутренний стандарт
1	НФ-АОЗ	НФ-АОЗ-d4
2	НФ-АМОЗ	НФ-АМОЗ-d5
3	НФ-АГД	НФ-АГД-3C ¹³
4	НФ-СЕМ	НФ-СЕМ-2N ¹⁵ ,C ¹³

5	НФ-ДСГ	НФ-АОЗ-d4
---	--------	-----------

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» – «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 при использовании новой партии реактивов, замене колонки и после ремонта или технического обслуживания прибора.

10.5 Подготовка проб

10.5.1 Подготовка проб мяса и мясной продукции, мяса птицы и продуктов из мяса птицы субпродуктов, рыбы, раков, морепродуктов, яиц и яичного порошка, меда, кишок и кишечного сырья.

10.5.1.1 Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани, рыбу – от крупных костей и кожи, креветки – от голов и грубого хитинового покрова.

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают, яичный порошок тщательно перемешивают.

30-100 г пробы (мышечная ткань, субпродукты, мясная и рыбная продукция, кишки и кишечное сырье) измельчают на гомогенизаторе.

Взвешивают в полипропиленовой пробирке объемом 50,0 см³ (4.2.2) 3,0 ± 0,05 г образца. Дозатором в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутреннего стандарта D₂ (10.2.10.9), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту.

10.5.1.2 Пробирку с пробой выдерживают 20 мин в темном месте. Добавляют 8 см³ раствора соляной кислоты (10.2.3) и 150 мм³ раствора НБА в метаноле (10.2.5) и помещают в шейкер (4.2.9) на 10 мин, выдерживают при температуре 37 °С на 16 часов. Охлаждают до комнатной температуры, добавляют 0,6 см³ раствора фосфата натрия (10.2.6), перемешивают, доводят рН до значения (7,0 ± 0,5) раствором гидроксида натрия (10.2.4). Значение рН контролируют по индикаторной бумаге (4.2.18). К нейтрализованному образцу добавляют 5 см³ этилацетата (4.3.13), встряхивают в шейкере (4.2.9) 5 минут, центрифугируют при 20 °С в течение 10 мин при 4000 об/мин (4.2.6). Органический слой количественно переносят в пластиковую пробирку объёмом 15,0 см³ (4.2.2). Описанную процедуру экстракции проводят ещё один раз. Экстракты объединяют, добавляют 100 мм³ деионизированной воды (4.3.9), упаривают на термостатируемом модуле (4.2.5) при температуре 40 °С до объема 50-100 мм³. Добавляют 0,6 см³ раствора для анализа ВЭЖХ-МС/МС (10.2.8), встряхивают на шейкере-вортексе (4.2.4) 1 минуту, помещают в ультразвуковую баню (4.2.7) на 1 минуту, добавляют 2 см³ гексана (4.3.4), встряхивают в шейкере 5 минут, центрифугируют при 20 °С в течение 10 мин при 4000 об/мин. Гексановый слой отбрасывают, остаток используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа. Объем инъекции 20 мм³. Допускается другие объемы инъекции, но не менее 5 мм³.

Допускается дополнительная очистка твердофазной экстракцией.³ Для этого, к остатку после упаривания на термостатируемом модуле (4.2.5) добавляют 2 см³ дихлорметана (4.3.15), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту, помещают в ультразвуковую баню (4.2.7) на 1 минуту, наносят на патрон с силикагелем, предварительно кондиционированным водой 3 см³ (4.3.9), метанолом 3 см³ (4.3.5), дихлорметаном 3 см³ (4.3.15), промывают дихлорметаном 2 см³ (4.3.15), 1 см³ гексана (4.3.4), сушат, элюируют 3 см³ ацетонитрила (4.3.1), элюат упаривают до объема 0-50 мм³, остаток растворяют в 0,6 см³ раствора для анализа ВЭЖХ-МС/МС (10.2.8), используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа. При необходимости перед анализом раствор фильтруют через шприцевые мембранные фильтры (4.2.13).

10.5.2 Подготовка проб молока, молочных продуктов

Молоко и молочные продукты перед анализом тщательно перемешивают.

Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245 (пункт 3.4)

10 г сыра, творога или творожных изделий тщательно растирают.

100 г твёрдого сыра измельчают на гомогенизаторе.

³ В некоторых образцах мяса курицы на низких уровнях концентрации (0,3, 0,5 мкг/кг) в анализе НФ-СЕМ 209.1/166.1 имеются интерферирующие сигналы, экранирующие сигнал семикрабазида, ТФЭ позволяет провести очистку и получить удовлетворительный сигнал. В образцах других типов матриц подобных случаев не фиксировали

Отобранную пробу взвешивают в полипропиленовой пробирке объемом 50,0 см³ (4.2.2) 3,0 ± 0,05 г. Дозатором в пробирку вносят 0,1 см³ раствора внутреннего стандарта D₂ (10.2.10.9), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее обработку пробы 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.

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 (2):

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

где X₁, X₂ – результаты параллельных определений массовой доли вещества, мкг/кг,

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

Если условие (2) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данной методикой измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие:

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}, \quad (3)$$

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

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

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

для $n = 4$

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r, \quad (4)$$

где σ_r – показатель повторяемости, % (таблица 1).

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

13 Оформление результатов измерений

Результат измерений 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 метаболитов нитрофуранов, для которых выполняется условие (2) или (3), мкг/кг;

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

В случае содержания метаболитов нитрофуранов в определяемых образцах более верхнего значения диапазона количественного определения, вносится запись: «более [верхнее значение] мкг/кг». В случае, содержания метаболитов нитрофуранов в образце менее нижнего значения диапазона количественного определения, вносится запись: «менее [нижнее значение] 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:

$$\left| X_1 - X_2 \right| \leq 0,01 R_{л} \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (5)$$

где X_1 и X_2 – результаты измерений массовой доли метаболитов нитрофуранов, полученные в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности;

$R_{л}$ – предел внутрилабораторной прецизионности, выраженный в относительных единицах. Значения предела внутрилабораторной прецизионности приведены в таблице 6.

14.2 При выполнении условия (5) приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднее арифметическое значение.

Таблица 1 - 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), $R_{Д}$, %
АОЗ		
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки	От 0,3 до 2,0 вкл.	36
	От 2,0 до 5,0 вкл.	30
	От 5,0 до 10,0 вкл.	28
	От 10,0 до 50,0 вкл.	25
	Св. 50 до 100 вкл.	25
Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,3 до 2,0 вкл.	36
	От 2,0 до 5,0 вкл.	30
	От 5,0 до 10,0 вкл.	28
	От 10,0 до 50,0 вкл.	22
	Св. 50 до 100 вкл.	19
Кишки и кишечное сырье	От 0,3 до 2,0 вкл.	21
	От 2,0 до 5,0 вкл.	17
	От 5,0 до 10,0 вкл.	14
	От 10,0 до 50,0 вкл.	11
АМОЗ		
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки	От 0,3 до 2,0 вкл.	36
	От 2,0 до 5,0 вкл.	30
	От 5,0 до 10,0 вкл.	28
	От 10,0 до 50,0 вкл.	22
	Св. 50 до 100 вкл.	19
Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,3 до 2,0 вкл.	33
	От 2,0 до 5,0 вкл.	28
	От 5,0 до 10,0 вкл.	25
	От 10,0 до 50,0 вкл.	19
	Св. 50 до 100 вкл.	17
Кишки и кишечное сырье	От 0,3 до 2,0 вкл.	18
	От 2,0 до 5,0 вкл.	17
	От 5,0 до 10,0 вкл.	16
	От 10,0 до 50,0 вкл.	14
АГД		
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки, раки	От 0,5 до 2,0 вкл.	61
	От 2,0 до 5,0 вкл.	36
	От 5,0 до 10,0 вкл.	28

	От 10,0 до 50,0 вкл	25
	Св. 50 до 100 вкл.	22
Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,5 до 2,0 вкл.	47
	От 2,0 до 5,0 вкл.	39
	От 5,0 до 10,0 вкл.	36
	От 10,0 до 50,0 вкл	28
	Св. 50 до 100 вкл.	25
Кишки и кишечное сырье	От 0,5 до 2,0 вкл.	53
	От 2,0 до 5,0 вкл.	33
	От 5,0 до 10,0 вкл.	21
	От 10,0 до 50,0 вкл	17
СЕМ		
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, креветки	От 0,3 до 2,0 вкл.	44
	От 2,0 до 5,0 вкл.	44
	От 5,0 до 10,0 вкл.	30
	От 10,0 до 50,0 вкл	25
	Св. 50 до 100 вкл.	22
Молоко и молочные продукты, яйца, яичный порошок, мёд, рыба, субпродукты	От 0,3 до 2,0 вкл.	44
	От 2,0 до 5,0 вкл.	39
	От 5,0 до 10,0 вкл.	33
	От 10,0 до 50,0 вкл	28
	Св. 50 до 100 вкл.	25
Кишки и кишечное сырье	От 0,3 до 2,0 вкл.	27
	От 2,0 до 5,0 вкл.	18
	От 5,0 до 10,0 вкл.	16
	От 10,0 до 50,0 вкл	15
ДСГ		
Мясо и мясные продукты, мясо птицы и продукты из мяса птицы, молоко и молочные продукты	от 0,3 до 0,5 вкл.	39
	от 0,5 до 1,0 вкл.	33
	от 1,0 до 2,0 вкл.	30
	от 2,0 до 5,0 вкл.	28
	от 5,0 до 10,0 вкл.	28
Креветки, раки, яйца, яичный порошок, мёд	от 0,3 до 0,5 вкл.	47
	от 0,5 до 1,0 вкл.	39
	от 1,0 до 2,0 вкл.	33
	от 2,0 до 5,0 вкл.	28
	от 5,0 до 10,0 вкл.	22
Кишки и кишечное сырье	от 0,5 до 1,0 вкл.	32
	от 1,0 до 2,0 вкл.	31
	от 2,0 до 5,0 вкл.	30
	от 5,0 до 10,0 вкл.	29
* - соответствует характеристики погрешности при доверительной вероятности P=0,95		

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, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

Приложение А (информационное)

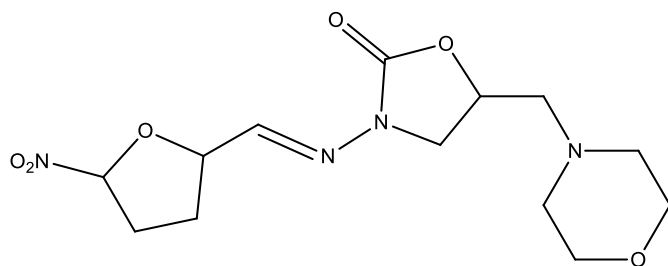
Библиография

[1] Письмо Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 8 августа 2012 года № ФС-ЕН-2/10267 «Об осуществлении отбора проб (образцов) от подконтрольных товаров для проведения лабораторных исследований в испытательных центрах (лабораториях)».

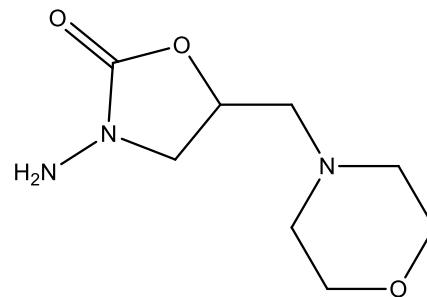
[2] РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

Приложение Б

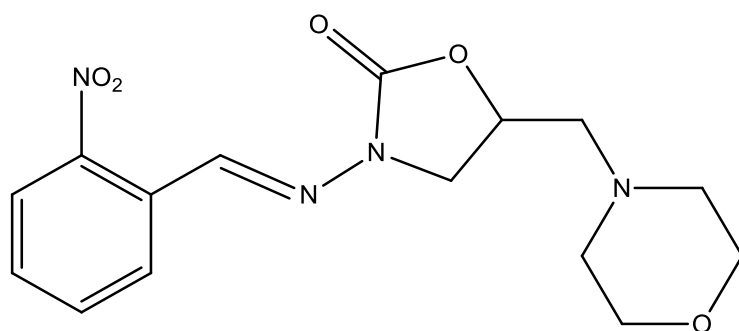
(справочное)



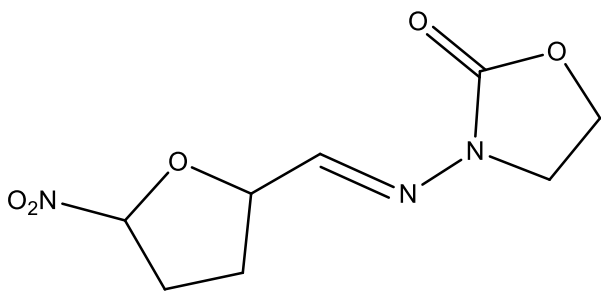
Фуралгадон



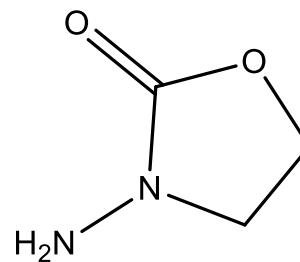
АМОЗ



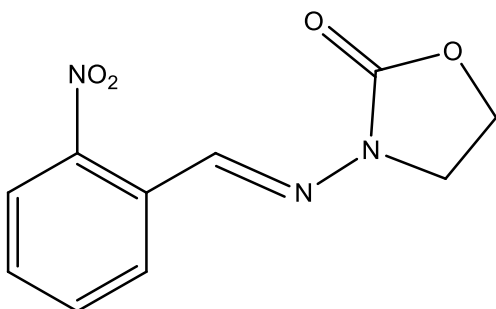
НФ-АМОЗ



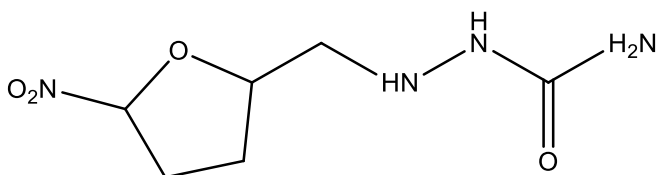
Фуразалидон



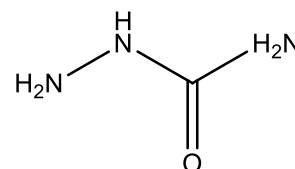
A03



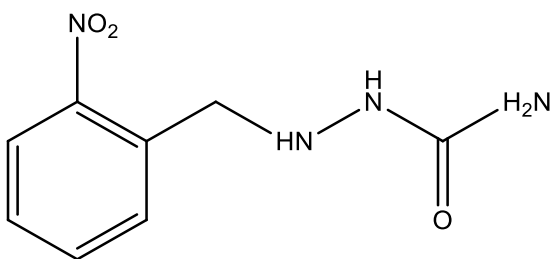
НФ-А03



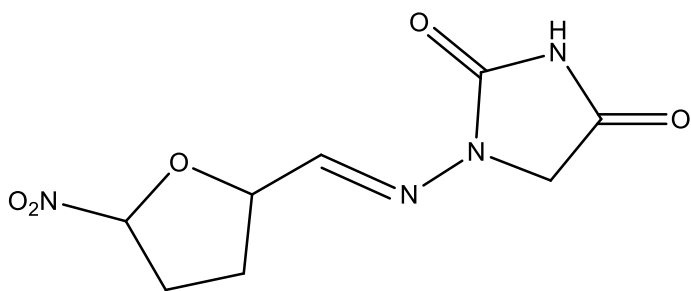
Нитрофуразон



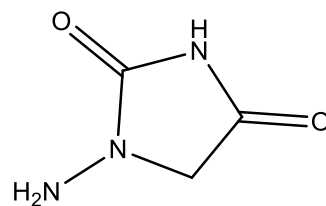
СЕМ



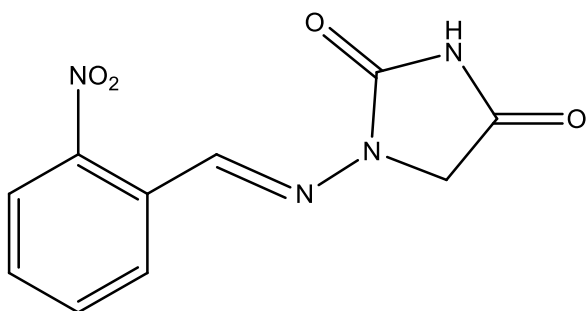
НФ-СЕМ



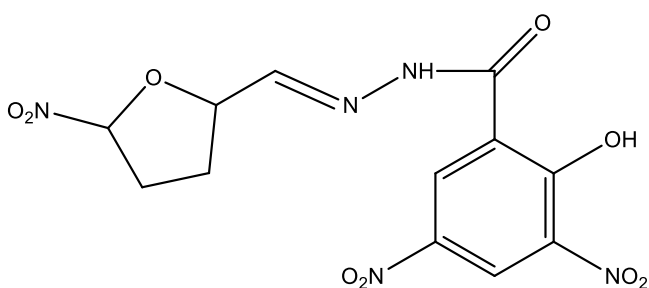
Нитрофурантоин



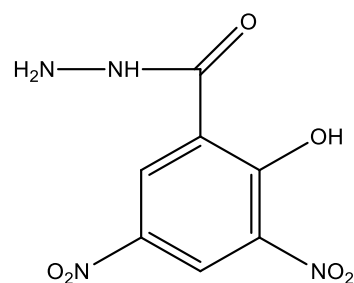
АГД



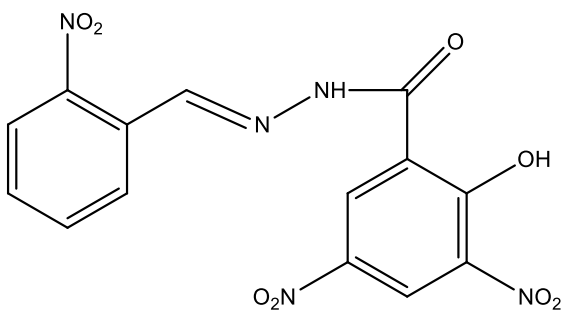
НФ-АГД



Нифурсол



ДСГ



НФ-ДСГ