

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



Методические указания

МУ А-1/127

УТВЕРЖДЕНО

Заместитель директора
ФГБУ «ВГНКИ»

А.В. Третьяков



08

20 24 г.

на основании доверенности
от 24.06.2024 № 23)

Методика (метод) измерений

**Методические указания по определению содержания антипротозойных
препаратов в пищевой продукции и кормах методом высокоэффектив-
ной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектиро-
ванием**

Аттестована:

ФГБУ «ВГНКИ»

(наименование организации,
осуществлявшей аттестацию методики)

Регистрационный номер
в Информационном фонде по
обеспечению единства измерений

99.1.31.2024.49436

г. Москва

2024

СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ

РАЗРАБОТАНО А.Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»,
Б.Институтом молекулярной тераностики Научно-технологического парка биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

(наименование инициатора разработки)

ИСПОЛНИТЕЛЬ: А.Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»,
Б.Институт молекулярной тераностики Научно-технологического парка биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

(полное наименование организации-разработчика)

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

Б. 119048, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

(почтовый адрес организации-разработчика)

А. тел.: +7 (495) 982-50-84, +7 (499) 253-14-91;

E-mail: vgnki@fsvps.gov.ru

Б. Тел: +7 (495) 609-14-00;

E-mail: rectorat@staff.sechenov.ru

Руководитель организации-разработчика

А. Киш Леонид Карольевич

(фамилия, имя, отчество)

Б. Носырев Александр Евгеньевич

(фамилия, имя, отчество)

СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

АТТЕСТОВАНА: федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский
государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов»

(полное наименование юридического лица, аттестовавшего методику (метод) измерений)

Уникальный номер записи об аккредитации в реестре аккредитованных лиц юридического лица,
аттестовавшего методику (метод) измерений: РОСС RU.0001.310354

Свидетельство об аттестации методики измерений

РОСС RU.0001.310354 - 01/13/2024

(номер свидетельства и дата его оформления)

Руководитель юридического лица,
аттестовавшего методику (метод) измерений

Киш Леонид Карольевич

(фамилия, имя, отчество)

СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

Регистрационный код методики измерений по Федеральному реестру

ФР. 1. 31. 2024. 49 136

СВЕДЕНИЯ О ТОМ, ЧТО МЕТОДИКА (МЕТОД) ИЗМЕРЕНИЙ ВВОДИТСЯ ВПЕРВЫЕ:

ВВЕДЕН (А) ВПЕРВЫЕ

Содержание

1 Назначение и область применения	1
2 Нормативные ссылки	2
3 Требования к показателям точности измерений	3
4 Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, материалам, реактивам	8
5 Метод измерений	11
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	11
7 Требования к квалификации операторов	12
8 Требования к условиям измерений	12
9 Отбор и хранение проб	12
10 Подготовка к выполнению измерений	14
11 Порядок выполнения измерений	27
12 Обработка результатов измерений	12
13 Оформление результатов измерений	32
14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории	32
Приложение А	36
Приложение Б	37
Приложение В	38
Приложение Г	39

1 Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации антипротозойных препаратов 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.

Настоящий стандарт распространяется на непереработанную и переработанную пищевую продукцию животного происхождения: продукты убоя и мясную продукцию, продукты убоя сельскохозяйственной птицы и продукцию их переработки, яйца птицы и продукты их переработки, молоко и молочную продукцию, мед, продукты на его основе, пищевую рыбную продукцию животного происхождения из уловов водных биологических ресурсов и объектов аквакультуры, а также комбикормовую продукцию и устанавливает метод определения остаточного содержания антипротозойных средств с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС).

Методика измерений входит в состав Методических указаний по определению содержания антипротозойных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Диапазон измерений массовой концентрации индивидуальных антипротозойных препаратов представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Диапазоны измерений массовой концентрации определяемых соединений в различных матрицах.

Соединение	Диапазон измерения в образцах				
	мяса, иных продуктов убоя (за исключением субпродуктов, жира, шпика) и мясной продукции от всех видов убойных животных и птиц, пищевой рыбной продукции животного происхождения из уловов водных биологических ресурсов и объектов аквакультуры, меда и продуктов на его основе, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	субпродуктов всех видов убойных животных и птиц, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	молока и молочной продукции, жира, шпика, масла, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	яиц и яичной продукции, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	кормов, млрд ⁻¹ (мкг/кг)
Имидокарб	От 1 до 1000	От 50 до 5000	От 1 до 1000	От 50 до 5000	От 50 до 5000
Диминазен	От 1 до 1000	От 50 до 5000	От 1 до 1000	От 50 до 5000	От 50 до 5000

При концентрации антипротозойных препаратов в образце, превышающей верхний предел диапазона измерения, допускается провести разбавление раствора для анализа подготовленной пробы (по п. 10.4) в d=10 раз по методике, изложенной в Приложении А, с последующим повторным анализом.

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

ГОСТ 12.2.085-2002 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.

ГОСТ 3652-69 (СТ СЭВ 394-88) Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия.

ГОСТ 4172-76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия.

ГОСТ 4288–76 Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса

ГОСТ 4814-57 Блоки мясные замороженные. Технические условия

ГОСТ 5848-73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия.

ГОСТ 6552-80 Кислота ортофосфорная. Технические условия.

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

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

ГОСТ 7636–85 Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа.

ГОСТ 8285-91 Жиры животные топленые. Правила приемки и методы испытания

ГОСТ 8756.0-70 Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию

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 10652-73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты, 2-водная (трилон Б). Технические условия.

ГОСТ 13496.0-2016 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 17681-82 Мука животного происхождения. Методы испытаний

ГОСТ 19792–2017 Мед натуральный. Технические условия

ГОСТ 20235.0-74 Мясо кроликов. Методы отбора образцов. 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, спреда, сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты

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

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

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

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

ГОСТ 31467–2012 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия

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 33790–2016 Кишки и мочевые пузыри говяжьи. Технические условия

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

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

ГОСТ ISO 5555-2016 Жиры и масла животные и растительные. Отбор проб

ГОСТ ISO 6497-2014 Корма. Отбор проб

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

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

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

ГОСТ Р 54704-2011 Блоки из жилованного мяса замороженные. Общие технические условия

ГОСТ Р 59369-2021. Корма для непродуктивных животных. Методы отбора проб.

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 измерения

Приписанные характеристики показателей точности результатов измерений массовой концентрации антипротозойных препаратов в образцах приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Диапазоны измерений, показатели неопределенности и ее составляющие

Объект	Диапазон измерения, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	Относительное среднеквадратическое отклонение результатов, полученное в условиях посто-ряемости, $U_r(\sigma_r)$, %	Относительное среднеквадратическое отклонение результатов, полученное в условиях воспроизводимости, $U_R(\sigma_R)$ %	Суммарная стандартная относительная неопределенность, U_c %	Границы относительной неопределенности при доверительной вероятности $P=0,95$, $\pm U_p^*$, %
Имидокарб					
Мясо, иные продукты убоя (за исключением субпродуктов, жира, шпика), мясная продукция от всех видов убойных животных и птиц, пищевая рыбная продукция животного происхождения из уловов водных биологических ресурсов и объектов аквакультуры, мед и продукты на его основе	От 1 до 100 включ.	11	12	6	27
	Св. 100 до 1000 вкл	5	9	5	21
Субпродукты всех видов убойных животных и птиц	От 50 до 500 включ.	11	12	6	27
	Св. 500 до 5000 вкл	5	9	5	21
Молоко и молочная продукция	От 1 до 100 включ.	9	20	10	35
	Св. 100 до 1000 вкл	7	18	4	22
Яйца и яичная продукция	От 50 до 500 включ.	5	7	4	16
	Св. 500 до 5000 вкл	5	7	4	9
Корма	От 50 до 500 включ.	5	14	7	31

Объект	Диапазон измерения, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	Относительное средне-квадратиче-ское откло-нение ре-зультатов, полученное в условиях по-сторояемости, $U_r(\sigma_r)$, %	Относительное среднеквадра-тическое от-клонение ре-зультатов, по-лученное в условиях вос-производимос-ти, $U_R(\sigma_R)$ %	Суммарная стандарт-ная отно-сительная неопреде-ленность, U_c %	Границы от-носительной неопределен-ности при до-верительной вероятности $P=0,95$, $\pm U_p^*$, %
	Св. 500 до 5000 вкл	5	6	3	13
Масло, жир, шпик	От 1,0 до 1000 вкл	7	8	4	16
Диминазен					
Мясо, иные продук-ты убоя (за исклю-чением субпродук-тов, жира, шпика), мясная продукция от всех видов убойных животных и птиц, пищевая рыбная продукция животно-го происхождения из уловов водных био-логических ресурсов и объектов аквакуль-туры, мед и продук-ты на его основе	От 1 до 100 вкл.	8	17	9	35
	Св. 100 до 1000 вкл	5	9	4	21
Субпродукты всех видов убойных жи-вотных и птиц	От 50 до 500 вкл.	6	7	5	14
	Св. 500 до 5000 вкл	5	7	4	11
Молоко и молочная продукция	От 1 до 100 вкл.	6	16	8	35
	Св. 100 до 1000 вкл	5	7	5	16
Яйца и яичная про-дукция	От 50 до 500 вкл.	11	12	7	27
	Св. 500 до 5000 вкл	11	12	12	16
Корма	От 50 до 500 вкл.	10	16	8	35
	Св. 500 до 5000 вкл	5	8	5	19
Масло, жир, шпик	От 1,0 до 1000 вкл	8	10	3	21

Объект	Диапазон измерения, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	Относительное среднеквадратическое отклонение результатов, полученное в условиях посто- яемости, $U_r(\sigma_r)$, %	Относительное среднеквадратическое отклонение результатов, полученное в условиях воспроизводимости, $U_R(\sigma_R)$ %	Суммарная стандартная относительная неопределенность, U_c %	Границы относительной неопределенности при доверительной вероятности $P=0,95$, $\pm U_p^*$, %
¹ - Соответствует характеристики погрешность при доверительной вероятности $P=0,95$					

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, оснащенный источником ионизации с электрораспылением, квадрупольными анализаторами, с диапазоном измерений от 25 до 1050 атомных единиц массы (а.е.м.), и относительным среднеквадратическим отклонением выходного сигнала по площади пика не более 10 %, с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС).

4.1.2 Система высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до $(50 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$.

4.1.3 Колонка хроматографическая, заполненная обращенно-фазным сорбентом C18, длиной не более 150 мм, с диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм.

4.1.4 Компьютер с установленным программным обеспечением.

4.1.5 Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

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

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

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

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

4.1.10 Бутыль стеклянная БВ-1000 по ГОСТ 34037.

4.1.11 Пробирки полипропиленовые вместимостью 15,0 см³ с завинчивающимися крышками.

4.1.12 Вials (флаконы) стеклянные вместимостью 2,0 см³ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм.

4.1.13 Картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 см³, заполненные сорбентом на основе сополимера дивинилбензола и винилпирролидона с частицами диаметром не более 50 мкм, массой 60 мг (например, Oasis HLB).

4.1.14 Модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и максимальной температурой термостатирования 60 °С.

4.1.15 Центрифуга лабораторная рефрижераторная со скоростью вращения ротора не менее 4000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 см³.

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

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

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

4.1.19 Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

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

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

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

4.1.23 Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 см³.

4.1.24 Ваккумное устройство для твердофазной экстракции.

4.1.25 Гомогенизатор лабораторный.

4.1.26 Вставки для виал объемом 200 – 300 мм³.

4.2 Реактивы, материалы

4.2.1 метанол, квалификация "х.ч.",

4.2.2 ацетонитрил, квалификация "х.ч.",

4.2.3 муравьиная кислота, квалификация "х.ч.",

4.2.4 формиат аммония, квалификация "х.ч.",

4.2.5 имидакарб, доля основного вещества 90%,

4.2.6 диминазен ацетурат, доля основного вещества 90%,

4.2.7 имидакарб-Д8, доля основного вещества 90%,

4.2.8 диминазен-13C₂,15N₄ дигидрохлорид, доля основного вещества 90%.

4.2.9 сульфат магния по ГОСТ 4523, квалификация "х.ч.".

4.2.10 хлорид натрия по ГОСТ 4233, квалификация "х.ч.".

4.2.11 сорбент С18 для дисперсионной твердофазной очистки с размером частиц от 40 до 60 мкм.

Примечание 1 – допускается применение стандартных образцов веществ с отличными содержаниями основного вещества от приведенных выше (при приготовлении точных концентраций исходных растворов стандартных образцов выполняют пересчет массы навески стандартного образца на чистое вещество по формуле 1).

Примечание 2 – допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками, не хуже приведенных выше.

5 Метод измерений

Измерения содержания лекарственных средств выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Детектирование анализируемых веществ проводят в режиме мониторинга выбранных реакций (*MRM*).

Используя полученные с применением метода внутреннего стандарта градуировочные характеристики, по площади пиков идентифицированных соединений находят их количественное содержание.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

Используемые в работе реактивы содержат вещества, относящиеся к 1 и 2 классам опасности, при работе с ними необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

Помещения, в которых проводят измерения и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

Операции по приготовлению и использованию градуировочных растворов аналитов и их изотопно-меченых аналогов следует проводить в вытяжном шкафу.

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

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

7 Требования к квалификации операторов

К операциям по подготовке проб и проведению измерений методом хромато-масс-спектрометрии допускают лиц, прошедших соответствующее обучение и освоивших настоящую методику измерений.

8 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

температура воздуха, °C (20 ± 5),

атмосферное давление, мм рт.ст. (630 – 800),

относительная влажность воздуха, % (20 – 80).

Выполнение измерений на приборах проводят в условиях, рекомендуемых в руководстве по эксплуатации к ним.

9 Отбор и хранение проб

9.1 Отбор и хранение проб

9.1.1 Отбор проб мяса, мясных продуктов, субпродуктов, шпика со шкурой и без шкуры, – по ГОСТ 7269, ГОСТ 32951, ГОСТ Р 51447, ГОСТ 20235.0, ГОСТ 4814, ГОСТ Р 54704, мясных полуфабрикатов – по ГОСТ 32951, кулинарных изделий и полуфабрикатов из рубленого мяса – по ГОСТ 4288.

9.1.2 Отбор проб мяса птицы, пищевых субпродуктов и полуфабрикатов из мяса птицы – по ГОСТ 31467.

9.1.3 Отбор проб колбасных изделий и продуктов из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц – по ГОСТ 9792, консервов – по ГОСТ 8756.0.

9.1.4 Отбор проб яиц – по ГОСТ 31654, яичных продуктов – по ГОСТ 31720.

9.1.5 Отбор проб молока и молочной продукции – по ГОСТ 26809.1.

9.1.6 Отбор проб молочной продукции – по ГОСТ 26809.2.

9.1.7 Отбор проб консервов молочных – по ГОСТ 29245.

9.1.8 Отбор проб продуктов переработки животных жиров – по ГОСТ ISO 5555, ГОСТ 8285

9.1.9 Отбор проб комбикормов производится по ГОСТ ISO 6497, ГОСТ Р 59369-2021, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 17681

9.1.10 Отбор проб кишечного сырья – по ГОСТ 33790, ГОСТ 33791.

9.1.11 Отбор проб рыбной продукции из рыбы и водных беспозвоночных – по ГОСТ 31339, ГОСТ 7636.

9.1.12 Отбор проб мёда по ГОСТ 19792.

Отбор проб производится в соответствии с указанными выше документами, а также иными нормативными документами, регламентирующими процедуру отбора проб объектов исследования, действующих и утвержденных, в соответствии с национальным законодательством.

9.1.13 Отобранные пробы, при отсутствии возможности испытаний в день отбора, хранят при условиях, указанных изготовителем в течение периода, не превышающего срок годности продукции, установленный изготовителем.

Отобранные пробы, при отсутствии возможности испытаний в день доставки в лабораторию, хранят при условиях, указанных изготовителем в течение периода, не превышающего срок годности продукции или при -18°C (кроме сухих и сыпучих) до трёх месяцев, но не более срока годности.

10 Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы.

10.1 Приготовление растворов

10.1.1 Приготовление подвижной фазы А

В стеклянную бутылку вместимостью $1000,0\text{ см}^3$ мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют $475,0\text{ см}^3$ деионизированной воды, $250,0\text{ см}^3$ метанола (4.2.1) и $275,0\text{ см}^3$

ацетонитрила (4.2.2), добавляют 0,5 г формиата аммония (4.2.4) и 5,0 см³ муравьиной кислоты (4.2.3). Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.1.16) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

10.1.2 Приготовление подвижной фазы Б

В стеклянную бутылку вместимостью 1000,0 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеривают 475,0 см³ метанола (4.2.1) и 525,0 см³ ацетонитрила (4.2.2), добавляют 0,5 г формиата аммония (4.2.4) и 0,5 см³ муравьиной кислоты (4.2.3). Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.1.16) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

10.1.3 Приготовление рабочих растворов

10.1.3.1 Приготовление исходных растворов стандартных образцов (C_o) имидокарба и диминазена с массовой концентрацией 1000 мкг/см³

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

$$m_p = \frac{m \cdot Ma \cdot Pa \cdot \rho}{Mc \cdot 100 \cdot C}, \quad (1)$$

где m_p —масса метанола, г;

m —масса стандартного образца, г;

Ma —молярная масса чистого вещества, г/моль;

Mc —молярная масса соли, г/моль;

Pa — степень чистоты стандартного образца, %;

ρ — плотность метанола, г/см³;

C — концентрация раствора C_o, г/см³.

Плотность метанола (ρ) берут из Таблицы 3 в зависимости от температуры воздуха в помещении.

При использовании стандартных образцов с точной заявленной массой, разведение исходного раствора производят непосредственно в таре производителя. Количество растворителя, необходимое для разведения рассчитывают по формуле 1. После растворения жидкий слой переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³.

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

Температура воздуха, °С	Плотность метанола (ρ), г/см ³
15,0	0,7961
15,5	0,7956
16,0	0,7952
16,5	0,7947
17,0	0,7942
17,5	0,7938
18,0	0,7933
18,5	0,7928
19,0	0,7924
19,5	0,7919
20,0	0,7914
20,5	0,7909
21,0	0,7905
21,5	0,7900
22,0	0,7895
22,5	0,7891
23,0	0,7886
23,5	0,7881
24,0	0,7877
24,5	0,7872
25,0	0,7867
25,5	0,7862
26,0	0,7858
26,5	0,7853
27,0	0,7848
27,5	0,7844
28,0	0,7839
28,5	0,7834
29,0	0,7829
29,5	0,7825
30,0	0,7820

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

10.1.3.2 Приготовление раствора (C_1) с массовой концентрацией аналитов в растворе 10 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают по 0,1 см³ растворов C_0 в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

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

10.1.3.3 Приготовление раствора (C_2) с массовой концентрацией аналитов в растворе 1 мкг/см³

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C_1 в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

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

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

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C_2 в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

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

10.1.3.5 Приготовление исходных растворов (D_0) внутренних стандартов с массовой концентрацией аналитов в растворах 1000 мкг/см³

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

Приготовленные растворы 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^3

Дозатором переменного объема отбирают по $0,1 \text{ см}^3$ растворов D_0 в мерную пробирку вместимостью $10,0 \text{ см}^3$, доводят до метки метанолом и перемешивают.

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

10.1.3.7 Приготовление раствора внутренних стандартов (D_2) с массовой концентрацией аналитов в растворе 1 мкг/см^3

Дозатором переменного объема отбирают $1,0 \text{ см}^3$ раствора D_1 в мерную пробирку вместимостью $10,0 \text{ см}^3$, доводят до метки метанолом и перемешивают.

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

10.1.4 Приготовление градуировочных растворов ($G_1 - G_5$) и ($S_1 - S_5$)

10.1.4.1 Приготовление образцов мяса, рыбы, меда, жира, шпика, масла, молока с концентрацией аналитов 1000 нг/см^3 (G_5)

В пластиковый флакон вместимостью $15,0 \text{ см}^3$ помещают $1,0 \text{ г}$ образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют $0,05 \text{ см}^3$ раствора D_2 (10.1.3.7) и $0,1 \text{ см}^3$ раствора C_1 (10.1.3.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.2 Приготовление образцов мяса, рыбы, меда, жира, шпика, масла, молока с концентрацией аналитов 100 нг/см^3 (G_4)

В пластиковый флакон вместимостью $15,0 \text{ см}^3$ помещают $1,0 \text{ г}$ образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добав-

ляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.7) и 0,1 см³ раствора C₂ (10.1.3.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.3 Приготовление образцов мяса, рыбы, меда, жира, шпика, масла, молока с концентрацией аналитов 10 нг/см³ (G3)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.7) и 0,1 см³ раствора C₃ (10.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.4 Приготовление образцов мяса, рыбы, меда, жира, шпика, масла, молока с концентрацией аналитов 5 нг/см³ (G2)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (9.1.3.7) и 0,05 см³ раствора C₃ (9.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.5 Приготовление образцов мяса, рыбы, меда, жира, шпика, масла, молока с концентрацией аналитов 1 нг/см³ (G1)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (9.1.3.7) и 0,01 см³ раствора C₃ (9.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.6 Приготовление образцов субпродуктов, яиц и кормов с концентрацией аналитов 5000 нг/см³ (S5)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₁ (9.1.3.6) и 0,5 см³ раствора C₁ (9.1.3.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.7 Приготовление образцов субпродуктов, яиц и кормов с концентрацией аналитов 1000 нг/см³ (S4)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₁ (9.1.3.6) и 0,1 см³ раствора C₁ (9.1.3.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.8 Приготовление образцов субпродуктов, яиц и кормов с концентрацией аналитов 500 нг/см³ (S3)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₁ (9.1.3.6) и 0,05 см³ раствора C₁ (9.1.3.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.9 Приготовление образцов субпродуктов, яиц и кормов с концентрацией аналитов 100 нг/см³ (S2)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₁ (9.1.3.6) и 0,1 см³ раствора C₂ (9.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.10 Приготовление образцов субпродуктов, яиц и кормов с концентрацией аналитов 50 нг/см³ (S1)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₁ (9.1.3.6) и 0,05 см³ раствора C₂ (9.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.2 Подготовка прибора к измерениям

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

10.2.1 Параметры настройки жидкостного хроматографа

температура колонки 40 °C;

скорость потока подвижной фазы 0,3 см³/мин.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: в начальный момент и до 2,0 мин элюирование в 100%-ной мобильной фазе А, с 2,0 по 4,0 мин градиентное элюирование к 100%-ной мобильной фазе Б, с 4,0 по 18,0 мин элюирование в 100%-ной мобильной фазе Б, с 18,0 по 18,10 мин переход к элюирова-

нию в 100%-ной мобильной фазе А, с 18,10 по 28,0 мин уравнивание колонки в 100%-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	Потенциал декластеризации, В	Энергия столкновений, эВ / Потенциал на выходе из ячейки, В
1	Имидокарб	349,4	188,2	210	36/15
			162,2	210	28/11
2	Диминазен	282,4	119,2	130	21/15
			135,2	130	19/15
3	Имидокарб-Д8	357,2	192,2	150	45/15
			224,1	150	34/15
4	Диминазен-13C2,15N4	288,2	253,4	50	13/10
			235,4	50	14/10

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 рабочие растворы аналитов в количестве, необходимом для получения массовых концентраций в соответствующих пределах для каждого определяемого вещества (10.1.4).

Внутренние стандарты используют согласно Таблице 5.

Таблица 5 – Аналиты и соответствующие им внутренние стандарты, используемые для построения градуировочного графика

Аналит	Внутренний стандарт
Имидокарб	Имидокарб-Д8
Диминазен	Диминазен-13C2,15N4

Градуировочную зависимость строят с помощью программы «Analyst» в координатах «отношение площади пика определяемого вещества к площади пика внутреннего стандарта этого вещества» – «концентрация определяемого вещества в градуировочном растворе к концентрации внутреннего стандарта», при этом в программе указывают концентрации стандартов и внутреннего стандарта согласно Таблице 6.

Таблица 6 – концентрации стандартов и внутренних стандартов для занесения в программу обчета

Градуировочный раствор	Концентрация внутренних стандартов в градуировочном растворе (нг/см ³)	Концентрация стандартов в градуировочном растворе (нг/см ³)
G1	50	1
G2	50	5
G3	50	10
G4	50	100
G5	50	1000
S1	50	50
S2	50	100
S3	50	500
S4	50	1000
S5	50	5000

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, иных продуктов убоя (за исключением субпродуктов)

Пробы от продуктов убоя и мясной продукции предварительно освобождают от костей, хрящей, грубой соединительной ткани, снимают оболочку с изделий и по возможности освобождают от обсыпки, начинки и других ингредиентов, в том числе не мясных компонентов, после чего тщательно измельчают на мясорубке дважды и/или гомогенизируют.

Подготовку мяса птицы, пищевых субпродуктов и полуфабрикатов из мяса птицы проводят по ГОСТ 31467–2012 (раздел 6).

Подготовку проб рыбы проводят по ГОСТ 7636 (пункт 2.1), водных беспозвоночных – по ГОСТ 7636 (пункт 2.9).

Подготовку проб кулинарных изделий и полуфабрикатов из рубленого мяса проводят по ГОСТ 4288–76 (пункт 2.4.2).

Подготовку проб топленых жиров проводят по ГОСТ 8285-91 (пункт 2.1.7).

Образец предварительно очищают от грубой соединительной ткани. 100 г пробы измельчают на гомогенизаторе (4.1.25) и взвешивают в полипропиленовой пробирке (4.1.11) 1,0 г образца. Дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₂ в случае мяса и мясных продуктов и D₁ в случае субпродуктов (10.1.3). Осторожно приливают 3 см³ 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 10 °С. Переливают органический слой в новую полипропиленовую пробирку, помещают ее на нагревательный модуль (4.1.14) и упаривают в токе азота при температуре 60 °С до 0,1–0,2 см³. К остатку приливают 2,0 см³ деионизированной воды, перемешивают в шейкере 5 с и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 20 °С. Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Перед нанесением экстракта на картридж (4.1.13) последовательно кондиционируют сорбент 2,0 см³ метанола и 2,0 см³ деионизированной воды. Затем

пропускают через картридж полученный экстракт (при процедуре очищения вакуум или избыточное давление не применяют). Промывают картридж 2,0 см³ деионизированной воды, сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 10 мин и элюируют аналиты 2,0 см³ метанола в новую полипропиленовую пробирку. Элюат помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе азота при температуре 60 °С до 0,1 - 0,2 см³. К полученному остатку приливают 0,5 см³ раствора мобильной фазы А (10.1.1) и тщательно перемешивают, переливают экстракт в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 см³, доводят объем фазой А до 1 см³ и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин при температуре 20 °С. Пипеточным дозатором переносят центрифугат в виалу для автосамплера жидкостного хроматографа. Полученный раствор используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

10.4.2 Подготовка проб яичного порошка

Подготовка проб яичных продуктов – по ГОСТ 31720-2012 (подраздел 4.3). Отобранную пробу яичного порошка перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают 1,0 г в полипропиленовой пробирке. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₁ (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

10.4.3 Обработка проб яиц и меланжа

Подготовка проб яичных продуктов – по ГОСТ 31720-2012 (подраздел 4.3). Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе, меланж тщательно перемешивают. Взвешивают 1,0 г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₁ (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

10.4.4 Подготовка проб молока

Подготовку проб молока и молочных продуктов проводят по ГОСТ 26809.1–2014 (раздел 6). Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ

29245–91 (пункт 3.4). Концентрированное молоко разводят деионизированной водой по ГОСТ 29245–91 (пункт 3.3).

Подготовку проб молочной продукции проводят по ГОСТ 26809.2–2014 (пункт 5.3.25).

Отобранную пробу перед анализом тщательно перемешивают. Взвешивают 1,0 г пробы в полипропиленовой пробирке. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₂ (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245 (пункт 3.4).

10.4.5 Подготовка проб кормов

Отобранную пробу корма измельчают на гомогенизаторе. Взвешивают 1,0 г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке. Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₁ (10.1.3). Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

10.4.6. Подготовка образцов меда и продуктов на его основе – по ГОСТ 19792–2017 (подраздел 7.2).

Мед тщательно перемешивают и взвешивают в полипропиленовой пробирке (4.1.11) 1,0 г образца. Дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₂. Приливают 2 см³ деионизированной воды и перемешивают до полного растворения меда (можно применять нагрев до 60 °С). Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Перед нанесением экстракта на картридж (4.1.13) последовательно кондиционируют сорбент 2,0 см³ метанола и 2,0 см³ деионизированной воды. Затем пропускают через картридж полученный экстракт (при процедуре очищения вакуум или избыточное давление не применяют). Промывают картридж 2,0 см³ деионизированной воды, сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 10 мин и элюируют аналиты 2,0 см³ метанола в новую полипропиленовую пробирку. Элюат помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе азота при температуре 60 °С до 0,1 - 0,2 см³. К полученному остатку приливают 0,5 см³ раствора мобильной фазы А (10.1.1) и тщательно

перемешивают, переливают экстракт в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 см³, доводят объем фазой А до 1 см³ и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин при температуре 20 °С. Пипеточным дозатором переносят центрифугат в вialу для автосамплера жидкостного хроматографа. Полученный раствор используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

10.4.7 Подготовка проб шпика, масла и жира

Навеску гомогенизированного образца массой 0,5±0,05 г переносят в пластиковый фалькон на 15 см³, добавляют 25 мм³ внутреннего стандарта D₁ и выдерживают в темном месте 20 мин. Добавляют 0,5 мл воды и 2 мл ацетонитрила, перемешивают на вортексе 1 мин. Добавляют 350 мг MgSO₄ (4.2.9) и 100 мг NaCl (4.2.10), встряхивают и помещают в ультразвуковую баню на 30 мин при 30°С. Центрифугируют в течение 10 мин при 4000 об/мин. Отбирают 1,5 мл надосадочной жидкости в эппендорф на 2 мл и добавляют 100 мг MgSO₄ и 450 мг сорбента C18 (4.2.11), встряхивают на вортексе 10 мин и центрифугируют при 15000 об/мин. Отбирают 1 мл супернатанта в вialу и упаривают досуха в потоке воздуха при 45°С. Реконструируют в 200 мкл метанола, переносят во вставку для вialы и анализируют методом ВЭЖХ/МС-МС.

11 Порядок выполнения измерений

При выполнении измерений в инжектор хроматографа вводят анализируемый раствор, полученный в п. 10.4. Подвижную фазу и реагенты предварительно проверяют на наличие 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 концентрации анализируемого вещества. При этом в программе, при обсчете, концентрация внутреннего стандарта в образце принимается равной 50 нг/см³, а в случае образца, анализируемого повторно и разведенного согласно приложению А, – 5 нг/см³.

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

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

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

r – значение предела повторяемости, % (таблица 7).

Полученные среднеарифметические значения двух результатов параллельных измерений анализируемой пробы округляют:

- в диапазоне значений от 1 до 100 мкг/кг включительно – до первого десятичного знака после запятой;
- в диапазоне значений от 100 до 5000 мкг/кг включительно – до целого числа.

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 концентрации аналита, мкг/кг;

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

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

для $n = 4$

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

где σ_r – показатель повторяемости, % (таблица 2).

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

12.4 В случае если результат анализа превышает верхний предел диапазона измерения, проводится повторный анализ раствора подготовленной пробы (по п. 10.4), который разводят в 10 раз согласно приложению А. Полученные результаты обрабатывают согласно п. 12.1 – 12.3 устанавливая характеристики погрешности, соответствующие найденным значениям в разбавленной пробе.

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

Таблица 7 - Значения пределов повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и критического диапазона при доверительной вероятности $P=0,95$

Объект	Диапазон измерения, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости), r , %	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между наибольшим и наименьшим четырьмя результатами измерений, полученных в одной лаборатории в условиях повторяемости), $CR_{0,95}(4)$, %	Предел внутрилабораторной воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в разное время, разными операторами и т.д.), R_r , %
Имидокарб				
Мясо, иные продукты убоя (за	От 1 до 100 включ.	30	40	33

Объект	Диапазон измерения, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости), r , %	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между наибольшим и наименьшим четырех результатов измерений, полученных в одной лаборатории в условиях повторяемости), $CR_{0,95}(4)$, %	Предел внутрилабораторной воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в разное время, разными операторами и т.д.), R_L , %
исключением субпродуктов, жира, шпика), мясная продукция от всех видов убойных животных и птиц, пищевая рыбная продукция животного происхождения из уловов водных биологических ресурсов и объектов аквакультуры, мед и продукты на его основе	Св. 100 до 1000 вкл	14	18	25
Субпродукты от всех видов убойных животных и птиц	От 50 до 500 включ.	30	40	33
	Св. 500 до 5000 вкл	14	18	25
Молоко и молочная продукция	От 1 до 100 включ.	25	32	55
	Св. 100 до 1000 вкл	19	25	50
Яйца и яичная продукция	От 50 до 500 включ.	14	18	19
	Св. 500 до 5000 вкл	14	18	19
Корма	От 50 до	14	18	39

Объект	Диапазон измерения, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости), r , %	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между наибольшим и наименьшим четырех результатов измерений, полученных в одной лаборатории в условиях повторяемости), $CR_{0,95}(4)$, %	Предел внутрилабораторной воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в разное время, разными операторами и т.д.), R , %
	500 включ.			
	Св. 500 до 5000 вкл	14	18	17
Масло, жир, шпик	От 1,0 до 1000 вкл	19	25	22
Диминазен				
Мясо, иные продукты убоя (за исключением субпродуктов, жира, шпика), мясная продукция от всех видов убойных животных и птиц, пищевая рыбная продукция животного происхождения из уловов водных биологических ресурсов и объектов аквакультуры, мед и продукты на его основе	От 1 до 100 включ.	22	29	47
	Св. 100 до 1000 вкл	14	18	25
Субпродукты от всех видов убойных животных и птиц	От 50 до 500 включ.	17	22	19
	Св. 500 до 5000 вкл	14	18	19

Объект	Диапазон измерения, млрд ⁻¹ (мкг/кг)	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости), r , %	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между наибольшим и наименьшим четырех результатов измерений, полученных в одной лаборатории в условиях повторяемости), $CR_{0,95}(4)$, %	Предел внутрилабораторной воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в разное время, разными операторами и т.д.), R , %
Молоко и молочная продукция	От 1 до 100 включ.	17	22	44
	Св. 100 до 1000 вкл	14	18	19
Яйца и яичная продукция	От 50 до 500 включ.	30	40	33
	Св. 500 до 5000 вкл	30	40	33
Корма	От 50 до 500 включ.	28	36	44
	Св. 500 до 5000 вкл	14	18	22
Масло, жир, шпик	От 1,0 до 1000 вкл	22	29	28

13 Оформление результатов измерений

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

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

где $\bar{X}_{k,c}$ – среднее арифметическое значение результатов n определений массовой концентрации аналита, признанных приемлемыми по 11.1, 11.2, мкг/кг;
 U_p – значение относительной расширенной неопределенности, % (таблица 2);
 d – коэффициент разбавления (принимает следующие значения: 1 – при отсутствии разбавления и 10 при разбавлении в 10 раз согласно Приложению А).

14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Оценку прецизионности результатов испытаний в условиях повторяемости и воспроизводимости проводят в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-1, ГОСТ ИСО 5725-2.

Периодичность получения результатов контрольных процедур и формы их регистрации приводят в документах лаборатории, устанавливающих порядок и содержание работ по организации методов контроля стабильности результатов измерений в пределах лаборатории.

14.1 Оперативный контроль процедуры измерений

Оперативный контроль процедуры измерений проводит исполнитель измерений с целью проверки готовности лаборатории к проведению измерений рабочих проб или оперативной оценки качества результатов измерений, полученных совместно с результатом контрольного измерения. Оперативный контроль проводят в следующих случаях:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, которые могут повлиять на стабильность результатов измерений (смена реактивов, использование средств измерений после ремонта и т.д.);
- при получении двух из трёх последовательных результатов измерений рабочих проб в виде медианы.

Оперативный контроль процедуры измерений проводит непосредственно исполнитель измерений на основе оценки отдельно взятой контрольной процедуры (K_k) и сравнения результата процедуры с нормативом контроля (K).

Оперативный контроль процедуры измерений проводят по следующей схеме:

- проведение контрольного измерения и получение результата контрольной процедуры;
- расчёт результата контрольной процедуры (K_k);
- расчет норматива контроля (K).

Реализация решающего правила контроля – сопоставление результата контрольной процедуры с нормативом контроля и выводы по результатам контроля.

Оперативный контроль процедуры измерений может быть проведён с применением метода добавок (по 14.2).

Применение метода добавок используют при наличии условий для создания проб с введенными добавками, адекватных анализируемым пробам и при отсутствии образцов для контроля.

При организации контроля исполнитель анализа в соответствии с выбранным алгоритмом проведения контрольной процедуры анализа выбирает (при необходимости готовит) средства контроля.

Результаты контрольных измерений, полученные при оперативном контроле процедуры анализа, проводимом с каждой серией рабочих проб, могут быть использованы при реализации любой из форм контроля стабильности результатов анализа.

14.2 Оперативный контроль процедуры измерений с применением метода добавок

Средствами контроля являются:

- пробы, исследуемые по методике (рабочие пробы);
- пробы продукции, исследуемые по методике с известной добавкой аналитов (рабочие пробы с добавкой).

Рабочие пробы для проведения оперативного контроля выбирают таким образом, чтобы массовая концентрация действующих веществ антипротозойных

препаратов в пробе с добавкой не превышала верхней границы диапазона измерений. Анализируемую пробу делят на 2 равные части. Одну часть оставляют без изменения, во вторую делают добавку действующего вещества антипротозойного препарата C_0 , в зависимости от показателя внутрилабораторной прецизионности согласно Приложению Г.

В соответствии с данной методикой в условиях повторяемости получают результаты контрольных измерений массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в рабочей пробе – X_n и в рабочей пробе с внесённой известной добавкой аналитов – $X_{n+\delta}$.

Результат контрольной процедуры K_k рассчитывают по формуле:

$$K_k = X_{n+\delta} - X_n - C_0, \text{ мкг/кг.} \quad (5)$$

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta_{\text{Л } X_{n+\delta}}^2 + \Delta_{\text{Л } X_n}^2}, \text{ мкг/кг,} \quad (6)$$

где $\pm \Delta_{\text{Л } X_{n+\delta}}$ – характеристика погрешности результатов контрольного измерения, соответствующая массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в пробе с добавкой, рассчитанная по формуле:

$$\Delta_{\text{Л } X_{n+\delta}} = 0,01\delta_{\text{Л}} X_{n+\delta}, \text{ мкг/кг,} \quad (7)$$

$\pm \Delta_{\text{Л } X_n}$ – характеристика погрешности результатов контрольного измерения, соответствующая массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в пробе, рассчитанная по формуле:

$$\Delta_{\text{Л } X_n} = 0,01\delta_{\text{Л}} X_n, \text{ мкг/кг,} \quad (8)$$

$\pm \delta_{\text{Л}}$ – относительное значение характеристики погрешности результатов измерений.

Реализация решающего правила контроля.

$$|K_k| \leq K$$

При невыполнении этого условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (8) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительному результату, и принимают меры к их устранению.

Примечание – Если в рабочей пробе установлено отсутствие аналитов на уровне нижней границы диапазона измерений, установленного методикой измерений, то эта рабочая проба с введённой добавкой действующего вещества антипротозойных препаратов C_0 может служить образцом для контроля с аттестованным значением C_0 . В этом случае результат контрольной процедуры K_k рассчитывают по формуле:

$$K_k = X - C_0, \text{ мкг/кг}, \quad (9)$$

где X – результат контрольного измерения массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в образце для контроля;

C_0 – массовая концентрация введенной добавки, мкг/кг.

Норматив контроля рассчитывают по формуле:

$$K = 0,01\delta_{\text{л}}C_{\text{д}} \text{ млрд}^{-1} (\text{мкг/кг}) \quad (10)$$

Приложение А

Разведение конечного раствора образца с концентрацией аналита, превышающей верхний предел диапазона измерений в $d=10$ раз

А.1 Из рабочего раствора подготовленной для анализа пробы (п. 10.4.), с помощью пипетки (дозатора) отбирают $0,1 \text{ см}^3$ и помещают в новую виалу для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

А.2. В виалу с помощью пипетки (дозатора) добавляют $0,9 \text{ см}^3$ раствора фазы А и перемешивают. Полученный раствор используют для повторного анализа.

Приложение Б

(справочное)

Пример хроматограммы имидакарба и его внутреннего стандарта имидакарба-Д8, полученной в ходе валидационного эксперимента, представлен на рисунке 1.

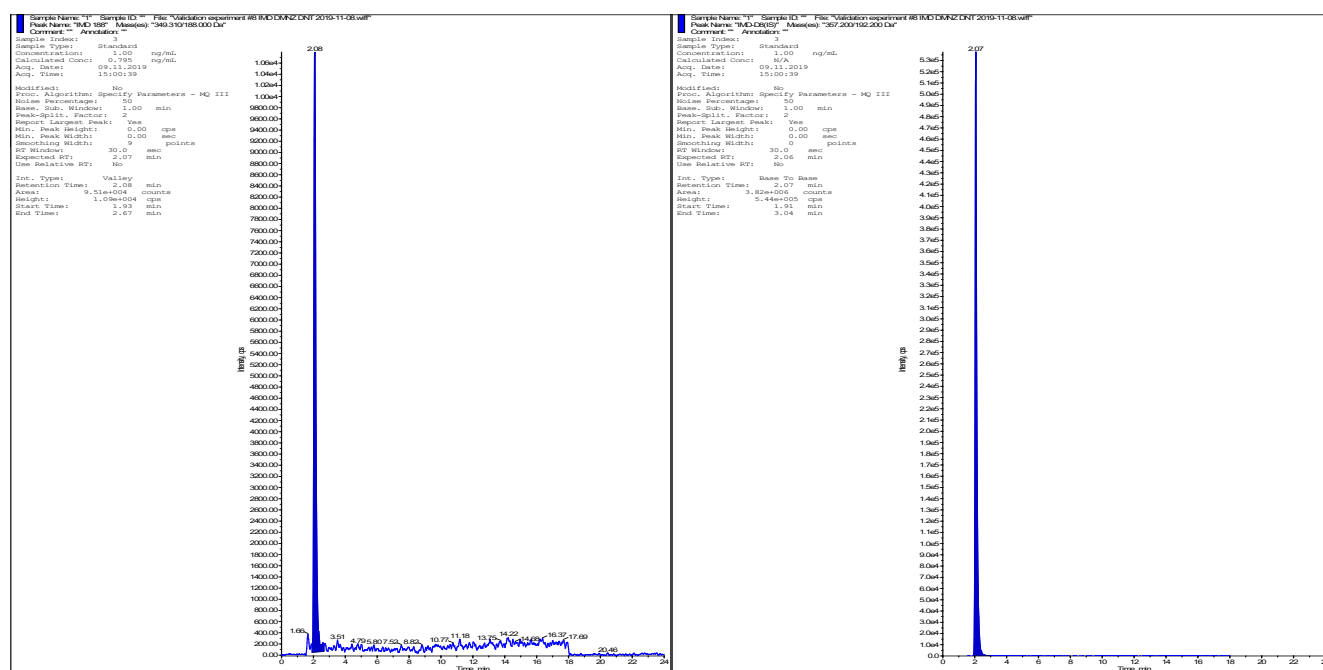


Рисунок 1. Хроматограмма имидакарба и имидакарба-Д8 с концентрацией в растворе 1 нг/см³ и 50 нг/см³ соответственно

Приложение В (справочное)

Добавка к пробе (разбавленной пробе) и коэффициент разбавления в зависимости от показателя внутрилабораторной прецизионности

Таблица В.1 – Значения величины добавки к пробе (разбавленной пробе) и коэффициента разбавления в зависимости от показателя внутрилабораторной прецизионности

Показатель внутрилабораторной прецизионности, σ_{R_L} , % содержания компонента в пробе	Значение величины добавки ω , % содержания компонента в пробе, не менее	Коэффициент разбавления пробы η , не менее
12	63	1,6
13	70	1,7
14	78	1,8
15	86	1,9
16	94	1,9
17	100	2,0
18	110	2,1
19	120	2,2
20	130	2,3
21	140	2,4
22	160	2,6
23	170	2,7

Приложение Г
(информационное)
Библиография

- [1] РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа
- [2] Р 50.2.003-2000 ГСИ «Внутренний оперативный контроль качества. Пакет программ Qcontrol».

МУ А-1/127

(обозначение документа,
регламентирующего методику измерений)

Ключевые слова:

Антипротозойные средства, продукция животного происхождения, мясо, мясная продукция, мясо птицы, продуктов из мяса птицы, молоко, молочная продукция, субпродукты, яйца, рыба, кишечное сырье, жировая ткань

Руководитель разработки:

Заместитель директора
ФГБУ «ВГНКИ»
(должность)

(личная подпись)

А.В. Третьяков
(инициалы, фамилия)

Исполнители:

(в части разработки: мясо и мясная продукция, мясо птицы и продукты из мяса птицы, молоко и молочная иные продукты от всех видов убойных животных и птиц, молоко и молочная продукция, рыбная продукция, мёд и продукты на его основе, субпродукты всех видов убойных животных и птиц, яйца птицы и продукты их переработки, кишечное сырье)

Старший научный сотрудник отдела безопасности пищевой и кормовой продукции
(должность)

(личная подпись)

И.В. Батов
(инициалы, фамилия)

(в части разработки: масло, шпик, жировая ткань)

Директор института
молекулярной терано-
логии
(должность)

(личная подпись)

А.Е. Носырев
(инициалы, фамилия)

