

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

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

**УТВЕРЖДАЮ**

**Заместитель директора, руководитель  
испытательного центра**

**ФГБУ «ВГНКИ»**



**М.А. Гергель**

**«25» декабря 2020 г.**

**Методические указания по определению остаточного содержания  
цефалоспоринов в продукции животноводства методом  
высокоэффективной жидкостной хроматографии с  
масс-спектрометрическим детектированием  
МУ А-1/077**

**Москва  
2020**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», 123022, г. Москва, Звенигородское ш.,5, Телефон/факс: (499) 253-14-68/ (499) 256-22-50; E-mail: kanc@vgnki.ru

Отдел безопасности пищевых продуктов (А.В. Третьяков, А.В. Сорокин, И. В. Батов, С.В. Белов, Е.А. Мамедова, О.Е. Латышев, А.Е. Жедулов, Е.А. Небера, Т.С. Грачева, Т.М. Сухова, С.А. Грачев, Д.Ю. Некрасов, А.Ю. Ефимов, Н.С. Бардюгов).

Методические указания аттестованы ФГБУ «ВГНКИ».

Свидетельство об аттестации № № 310354-0067/2020 от 25.12.2020г

Регистрационный номер методик измерений по Федеральному реестру  
ФР.1.31.2021.39544

## Содержание

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Назначение и область применения                                                      | 4  |
| 2 Нормативные ссылки                                                                   | 4  |
| 3 Требования к показателям точности измерений                                          | 6  |
| 4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам | 7  |
| 5 Метод измерений                                                                      | 9  |
| 6 Требования безопасности, охраны окружающей среды                                     | 10 |
| 7 Требования к квалификации операторов                                                 | 10 |
| 8 Требования к условиям измерений                                                      | 10 |
| 9 Отбор и хранение проб                                                                | 11 |
| 10 Подготовка к выполнению измерений                                                   | 11 |
| 11 Порядок выполнения измерений                                                        | 18 |
| 12 Обработка результатов измерений                                                     | 18 |
| 13 Оформление результатов измерений                                                    | 18 |
| 14 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории       | 19 |
| Приложение А                                                                           | 20 |

## **1 Назначение и область применения**

Настоящий документ устанавливает методику измерений остаточного содержания пефлоксацина 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 продукции животноводства, а также мониторинг продукции животноводства по остаточному содержанию лекарственных средств.

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

Диапазон измерений массовой доли пефлоксацина в продукции животноводства от 1 до 2000 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 21748-2012. Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений.

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

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

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

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

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

ГОСТ 12.3.002-2014 Система стандартов безопасности труда. Процессы производственные. Общие требования безопасности.

ГОСТ 12.4.011-89 Система стандартов безопасности труда. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация.

ГОСТ OIML R 76-1-2011 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания.

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

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия.

ГОСТ 4814-57 Блоки мясные замороженные. Технические условия.

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

ГОСТ 5962-2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья.

Технические условия

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

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

ГОСТ 19792-2017 Мед натуральный. Технические условия.

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

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

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

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.



|             |                        |    |    |    |    |
|-------------|------------------------|----|----|----|----|
| Субпродукты | От 1 до 100<br>вкл.    | 33 | 10 | 15 | 28 |
|             | От 100 до<br>2000 вкл. | 20 | 6  | 10 | 17 |
| Мёд         | От 1 до 100<br>вкл.    | 30 | 10 | 14 | 28 |
|             | От 100 до<br>2000 вкл. | 20 | 8  | 10 | 22 |
| Молоко      | От 1 до 100<br>вкл.    | 30 | 10 | 15 | 28 |
|             | От 100 до<br>2000 вкл. | 18 | 7  | 10 | 19 |
| Яйца        | От 1 до 100<br>вкл.    | 33 | 10 | 15 | 28 |
|             | От 100 до<br>2000 вкл. | 18 | 6  | 8  | 17 |

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, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам**

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.

##### **4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства**

4.1.1 Масс-спектрометр с гибридным квадрупольным анализатором с диапазоном измерений  $m/z$  от 5 до 1200 «6500 QTRAP» (AB SCIEX, Канада, США) и компьютером с установленным программным обеспечением Analyst 1.6.2 (AB SCIEX, Канада, США). номер в Государственном реестре средств измерений № 58075-14.

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

4.1.3 Колонка хроматографическая обращённо-фазная длиной 150 мм, с диаметром частиц сорбента не более 5.0 мкм.

4.1.4 Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

4.1.5 Весы Discovery DV214C (Ohaus, Швейцария), номер в Государственном реестре средств измерений 33646-06.

4.1.6 Весы электронные ЕК-300i (A&D Company, Япония), номер в Государственном реестре средств измерений 25313-06.

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

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

4.1.9 Бутыль стеклянная БВ-1000 по ГОСТ 34037.

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

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

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

4.1.13 Центрифуга лабораторная рефрижераторная со скоростью вращения не менее 4000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 см<sup>3</sup>.

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

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

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

4.1.17 Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

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

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

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

4.1.21 Микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 см<sup>3</sup>.

## **4.2 Реактивы, материалы**

4.2.1 эфир диэтиловый, квалификация «ч.д.а.»;

4.2.2 натрия хлорид по ГОСТ 4233, квалификация «х.ч.»;

4.2.3 н-гексан, квалификация «х.ч.»;

4.2.4 кислота муравьиная по ГОСТ 5848, квалификация «ч.д.а.»;

4.2.5 вода дистиллированная по ГОСТ 6709;

4.2.6 метанол, квалификация «х.ч.» по ГОСТ 6995;

4.2.7 ацетонитрил, квалификация по ТУ 6-09-06-1092-83 «ч.д.а.»;

4.2.8 аммония гидроксида водный раствор, с массовой долей основного вещества не менее 28%;

4.2.9 пefлоксацин мезилат дигидрат, с массовой долей основного вещества не менее 90%;

4.2.10 пefлоксацин-Д5, с массовой долей основного вещества не менее 90%.

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

## **5 Метод измерений**

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

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

## **6 Требования безопасности, охраны окружающей среды**

Используемые в работе реактивы содержат вещества, относящиеся к 1 и 2 классам опасности, при работе с ними необходимо соблюдать требования

безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

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

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

В связи с тем, что при работе на масс-спектрометре используются сжатые газы, следует соблюдать правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением ПБ 10-115-96 Госгортехнадзор России, ГОСТ 12.2.085.

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

## **7 Требования к квалификации операторов**

К операциям по подготовке проб и проведению измерений методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием 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, °C                                  | (20 ± 5).    |
| атмосферное давление, мм рт.ст.                          | (630 – 800). |
| относительная влажность воздуха при температуре 25 °C, % | (40 – 80).   |

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

## 9 Отбор и хранение проб

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

## 10 Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы.

### 10.1 Приготовление растворов

#### 10.1.1 Приготовление раствора хлорида натрия концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>

В мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> (4.1.10) вносят 58,4 г хлорида натрия (результат взвешивания учитывают с точностью до первого десятичного знака), доводят объем до метки дистиллированной водой (4.2.6), перемешивают.

Раствор хранят при комнатной температуре. Срок годности - не более 3 мес.

#### 10.1.2 Приготовление растворов подвижных фаз

Подвижная фаза А

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см<sup>3</sup> мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 995 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 5 см<sup>3</sup> муравьиной кислоты (4.2.5). Раствор перемешивают.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

Подвижная фаза Б

В стеклянную бутылку вместимостью 1000 см<sup>3</sup> мерным цилиндром отмеряют 995 см<sup>3</sup> метанола (4.2.7) и 5 см<sup>3</sup> муравьиной кислоты. Раствор перемешивают.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

#### 10.1.3 Приготовление рабочих растворов

При приготовлении исходных растворов аналитов рассчитывают навеску, эквивалентную 10,0 мг действующего вещества, исходя из массовой доли в реактиве.

##### 10.1.2.1 Приготовление исходных растворов ( $C_0$ )

На весах (4.1.6) взвешивают массу реактива, эквивалентную 4,0-6,0 мг основного вещества (с учетом массовой доли в реактиве), помещают навеску в полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см<sup>3</sup> (4.1.11). В пробирку весовым методом добавляют метанол, масса которого рассчитывается по формуле (1):

$$m_p = \frac{m \cdot M_a \cdot P_a \cdot \rho}{M_c \cdot 100 \cdot C}, \quad (1)$$

где  $m_p$ —масса метанола, г;

$m$ —масса стандартного образца, г;

$M_a$ —молярная масса чистого вещества, г/моль;

$M_c$ —молярная масса соли стандартного образца, г/моль;

$P_a$ —степень чистоты стандартного образца, %;

$\rho$ —плотность метанола, г/см<sup>3</sup>;

$C$ —концентрация раствора  $C_0$ , г/см<sup>3</sup>.

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

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

| Температура воздуха, °С | Плотность метанола ( $\rho$ ), г/см <sup>3</sup> |
|-------------------------|--------------------------------------------------|
| 15,0                    | 0,7961                                           |
| 15,5                    | 0,7956                                           |
| 16,0                    | 0,7952                                           |
| 16,5                    | 0,7947                                           |
| 17,0                    | 0,7942                                           |
| 17,5                    | 0,7938                                           |
| 18,0                    | 0,7933                                           |
| 18,5                    | 0,7928                                           |
| 19,0                    | 0,7924                                           |
| 19,5                    | 0,7919                                           |
| 20,0                    | 0,7914                                           |
| 20,5                    | 0,7909                                           |
| 21,0                    | 0,7905                                           |
| 21,5                    | 0,7900                                           |
| 22,0                    | 0,7895                                           |
| 22,5                    | 0,7891                                           |
| 23,0                    | 0,7886                                           |
| 23,5                    | 0,7881                                           |
| 24,0                    | 0,7877                                           |
| 24,5                    | 0,7872                                           |
| 25,0                    | 0,7867                                           |
| 25,5                    | 0,7862                                           |
| 26,0                    | 0,7858                                           |
| 26,5                    | 0,7853                                           |
| 27,0                    | 0,7848                                           |
| 27,5                    | 0,7844                                           |

|      |        |
|------|--------|
| 28,0 | 0,7839 |
| 28,5 | 0,7834 |
| 29,0 | 0,7829 |
| 29,5 | 0,7825 |
| 30,0 | 0,7820 |

Массовая концентрация аналита в растворе  $C_0$  составляет 1 мг/см<sup>3</sup>.

Срок хранения растворов при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 1 года.

#### 10.1.2.2 Приготовление рабочего раствора ( $C_1$ )

С помощью автоматического дозатора (4.1.9) отбирают 0,1 см<sup>3</sup> раствора  $C_0$  пefлоксацина переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе  $C_1$  пefлоксацина составляет 10 мкг/см<sup>3</sup>.

Срок хранения раствора  $C_1$  при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 6 месяцев.

#### 10.1.2.3 Приготовление рабочего раствора ( $C_2$ )

С помощью автоматического дозатора отбирают 1,0 см<sup>3</sup> раствора  $C_1$  и переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе  $C_2$  пefлоксацина составляет 1 мкг/см<sup>3</sup>.

#### 10.1.2.4 Приготовление рабочего раствора ( $C_3$ )

С помощью автоматического дозатора отбирают 1,0 см<sup>3</sup> раствора  $C_2$  и переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация в растворе  $C_3$  пefлоксацина составляет 0,1 мкг/см<sup>3</sup>.

Срок хранения растворов  $C_2$  -  $C_3$  при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 3 месяцев.

#### 10.1.2.5 Приготовление исходных растворов ( $D_0$ ) внутренних с массовой концентрацией 1 мг/см<sup>3</sup>

На весах (4.1.6) взвешивают 4,0-6,0 мг внутренних стандартов аналитов и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см<sup>3</sup>. В пробирки весовым методом добавляют растворитель - метанол, масса которого рассчитывается по формуле (1).

Срок хранения растворов при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – 1 год.

#### 10.1.2.6 Приготовление рабочего раствора ( $D_1$ ) внутренних стандартов

С помощью автоматического дозатора отбирают 0,1 см<sup>3</sup> раствора  $D_0$  пefлоксацина-Д5 и переносят этот объём в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят объём раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация внутреннего стандарта пefлоксацина-Д5 в растворе  $D_1$  составляет 10 мкг/см<sup>3</sup>.

Срок хранения раствора при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 6 месяцев.

#### *10.1.2.7 Приготовление рабочего раствора ( $D_2$ ) внутренних стандартов*

С помощью автоматического дозатора отбирают 1 см<sup>3</sup> раствора  $D_1$  и переносят этот объем в мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup>, доводят объем раствора до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация внутреннего стандарта пефлоксацина- $D_5$  в растворе  $D_2$  составляет 1 мкг/см<sup>3</sup>.

Срок хранения раствора – не более 3 месяцев.

### **10.1.3 Приготовление градуировочных растворов ( $G_1$ – $G_5$ ) пефлоксацина**

#### **10.1.3.1 Приготовление градуировочного раствора ( $G_1$ )**

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г образца, не содержащего пефлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $D_2$  (10.1.2.7) и 0,01 см<sup>3</sup> раствора  $C_3$  (10.1.2.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пефлоксацина в приготовленном образце составляет 1 мкг/кг.

#### **10.1.3.2 Приготовление градуировочного раствора ( $G_2$ )**

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г образца, не содержащего пефлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $D_2$  и 0,1 см<sup>3</sup> раствора  $C_3$ , встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пефлоксацина в приготовленном образце составляет 10 мкг/кг.

#### **10.1.3.3 Приготовление градуировочного раствора ( $G_3$ )**

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г образца, не содержащего пефлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $D_2$  и 0,1 см<sup>3</sup> раствора  $C_2$ , встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пефлоксацина в приготовленном образце составляет 100 мкг/кг.

#### **10.1.3.4 Приготовление градуировочного раствора ( $G_4$ )**

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г образца, не содержащего пефлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $D_2$  и 0,05 см<sup>3</sup> раствора  $C_1$ , встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пефлоксацина в приготовленном образце составляет 500 мкг/кг.

### 10.1.3.5 Приготовление градуировочного раствора (G<sub>5</sub>)

В пластиковый флакон вместимостью 15 см<sup>3</sup> помещают (1,0 ± 0,05) г образца, не содержащего пefлоксацин (бланк) (для каждого типа матриц готовят индивидуальные градуировочные растворы). С помощью дозатора переменного объема к образцу добавляют 0,05 см<sup>3</sup> раствора D<sub>2</sub> и 0,2 см<sup>3</sup> раствора C<sub>1</sub>, встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Затем проводят процедуру пробоподготовки согласно разделу 10.4.

Концентрация пefлоксацина в приготовленном образце составляет 2000 мкг/кг.

Для удобства внесения аликвот стандартных растворов, можно использовать информацию, указанную в таблице 3. Готовые градуировочные растворы, прошедшие стадию пробоподготовки хранятся не более 24 часов при температуре от 0 °C до 5 °C.

Таблица 3 – Приготовление градуировочных растворов.

| Название образца | Рабочий раствор C <sub>1</sub> , см <sup>3</sup> | Рабочий раствор C <sub>2</sub> , см <sup>3</sup> | Рабочий раствор C <sub>3</sub> , см <sup>3</sup> | Рабочий раствор D <sub>2</sub> , мм <sup>3</sup> |
|------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Бланк            | –                                                | –                                                | –                                                | 50                                               |
| G <sub>1</sub>   | –                                                | –                                                | 0,01                                             |                                                  |
| G <sub>2</sub>   | –                                                | –                                                | 0,1                                              |                                                  |
| G <sub>3</sub>   | –                                                | 0,1                                              | –                                                |                                                  |
| G <sub>4</sub>   | 0,05                                             | –                                                | –                                                |                                                  |
| G <sub>5</sub>   | 0,2                                              | –                                                | –                                                |                                                  |

### 10.2 Подготовка прибора к измерениям

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

#### 10.2.1 Параметры настройки системы высокоэффективной жидкостной хроматографии

температура колонки 40°C;

скорость потока подвижной фазы 0,25 см<sup>3</sup>/мин;

объем вводимой пробы 0,02 см<sup>3</sup>.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: с 0,0 по 7,0 минуту градиентное элюирование от 85 % до 10 % фазы А; с 7,0 по 7,1 минуту переход от 10 % до 0 % фазы А, с 7,1 по 8,0 минуту элюирование 0 % фазы А, с 8,0 по 8,2 минуту переход от 0 % до 85 % фазы А, с 8,2 по 15,0 минуту – уравнивание колонки в 85 % фазы А.

#### 10.2.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Таблица 4 – Параметры в режиме MRM в условиях электрораспыления с регистрацией положительных ионов

| № | Определяемое вещество | Ион-предшественник, m/z | Дочерние ионы, m/z | Время удерживания, мин. | Энергия столкновений, эВ / Потенциал на выходе из ячейки, В |
|---|-----------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1 | Пefлоксацин           | 334,2                   | 316,2/290,2        | 4,42                    | 25/18<br>24/17                                              |
| 2 | Пefлоксацин-D5        | 339,0                   | 321,1              | 4,41                    | 29/19                                                       |

Напряжение на зонде (IS): + 5500 В  
Разрешение квадруполей Q1/Q3: единичное;  
Поток газа для фрагментации (CAD): 6

Контроль чувствительности масс-спектрометра осуществляют введением 0,02 см<sup>3</sup> градуировочного раствора G<sub>1</sub> в инжектор системы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученное значение соотношения сигнал/шум для каждого MRM перехода определяемого вещества должно быть не менее 10.

### **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 9.1.3. Для приготовления проводят обработку «чистых» проб (бланков) согласно разделу 10.4.

Для определения массовой доли пefлоксацина в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в качестве внутреннего стандарта используют пefлоксацин-D5.

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». При построении градуировочной зависимости используют линейную регрессию, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

Для нахождения градуировочной характеристики в инжектор системы высокоэффективной жидкостной хроматографии вводят по 0,02 см<sup>3</sup> градуировочных растворов. Подвижную фазу, реагенты и матрицу предварительно проверяют на наличие пefлоксацина или других соединений, мешающих определению.

### **10.4 Подготовка проб**

#### **10.4.1 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, субпродуктов, мяса и субпродуктов птицы, рыбы**

Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. Пробу измельчают на гомогенизаторе и взвешивают по (1,0 ± 0,05) г гомогенизированной ткани в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см<sup>3</sup>. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> рабочего раствора внутреннего стандарта D<sub>2</sub>, помещают её в шейкер для перемешивания в течение 20 мин и выдерживают в темноте при комнатной температуре 10 минут. Приливают 3 см<sup>3</sup> ацетонитрила (4.2.8), 250 мм<sup>3</sup> водного раствора гидроокиси аммония (4.2.9) и помещают на 10 мин в шейкер для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Переливают надосадочную жидкость в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см<sup>3</sup>. К осадку приливают 750 мм<sup>3</sup> дистиллированной воды (4.2.6), 3 см<sup>3</sup> ацетонитрила, 250 мм<sup>3</sup>

водного раствора гидроокиси аммония, повторяют экстракцию на шейкере и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Надосадочные жидкости, полученные при первой и второй экстракциях, объединяют, после чего обезжиривают путем добавления 3 см<sup>3</sup> гексана (4.2.4), 3 см<sup>3</sup> диэтилового эфира (4.2.2) и 250 мм<sup>3</sup> раствора хлорида натрия (10.1.1). Пробирку помещают в шейкер на 10 мин, затем центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин. Удаляют верхний из образовавшихся слоев (гексан) и упаривают остаток до 0,1 см<sup>3</sup> в токе азота при 50°С. Полученный остаток переносят в микроцентрифужную пробирку, приливают подвижную фазу А (10.1.2) до 1 см<sup>3</sup> и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Дозатором переменного объема переносят центрифугат в виалу для автосамплера системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (4.1.12). Полученный раствор используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

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

Отобранную пробу яичного порошка перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> рабочего раствора внутренних стандартов D<sub>2</sub>. Далее обработку пробы и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

#### **10.4.3 Подготовка проб яиц и меланжа**

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе, меланж тщательно перемешивают. Взвешивают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> рабочего раствора внутренних стандартов D<sub>2</sub>. Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

#### **10.4.4 Подготовка проб молока**

Отобранную пробу перед анализом тщательно перемешивают.

Взвешивают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см<sup>3</sup>. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> рабочего раствора внутренних стандартов D<sub>2</sub>. Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1. Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245 (пункт 3.4).

#### **10.4.5 Подготовка проб мёда**

Отобранную пробу перед анализом тщательно перемешивают.

Взвешивают ( $1,0 \pm 0,05$ ) г гомогенизированной пробы в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см<sup>3</sup>, добавляют 5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, тщательно перемешивают. Дозатором переменного объема в пробирку вносят 0,05 см<sup>3</sup> рабочего раствора внутренних стандартов D<sub>2</sub>. Далее обработку проб и подготовку к хроматографированию проводят по 10.4.1.

## 11 Порядок выполнения измерений

При выполнении измерений в инжектор системы высокоэффективной жидкостной хроматографии вводят 0,02 см<sup>3</sup> анализируемого раствора. Подвижную фазу и реагенты предварительно проверяют на наличие пefлоксацина или других соединений, мешающих определению. С помощью установленных градуировочных характеристик проводят количественное определение пefлоксацина в анализируемом растворе.

## 12 Обработка результатов измерений

Результаты измерений обрабатываются с помощью программы Analyst и выдаются в виде массовой доли анализируемого вещества.

12.1 За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (1):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r, \quad (1)$$

где  $X_1, X_2$  – результаты параллельных определений массовой доли вещества, мкг/кг.  
 $r$  – значение предела повторяемости, % (таблица 2).

12.2 Если условие (1) 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

$$\frac{4 \cdot X_{\max} - X_{\min} \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}, \quad (2)$$

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  $n = 4$

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

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

12.3 Если условие (2) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

## 13 Оформление результатов измерений

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

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

где  $\bar{X}_{k,c}$  – среднее арифметическое значение результатов  $n$  определений массовой доли аналита, признанных приемлемыми по 11.1, 11.2, мкг/кг;  
 $U_{k,c}$  – значение относительной расширенной неопределенности, % (таблица 2).

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

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории рекомендуется осуществлять по ГОСТ Р ИСО 5725-6, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 и показателя правильности по 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6. Проверка стабильности может быть осуществлена с применением контрольных карт Шухарта.

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

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

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

**Приложение А**  
**(информационное)**  
**Библиография**

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