ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56962— 2016

РЫБА, НЕРЫБНЫЕ ОБЪЕКТЫ И ПРОДУКЦИЯ ИЗ НИХ

Метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

проект

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 300 «Рыбные продукты пищевые, кормовые, технические и упаковка»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 14 июня 2016 г. № 621-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной систе*ме общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет *(www.gost.ru)*

© Стандартинформ, 2016

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Сущность метода . . . 2
4 Требования безопасности и условия выполнения измерений . . . 2
5 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы . . . 2
6 Подготовка к проведению измерений . . . 4
6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов . . . 4
6.2 Приготовление растворов . . . 4
6.3 Приготовление градуировочных растворов . . . 5
7 Отбор и подготовка проб . . . 7
7.1 Отбор проб . . . 7
7.2 Подготовка проб . . . 7
8 Порядок выполнения анализа . . . 8
8.1 Условия хроматографических измерений . . . 8
8.2 Построение градуировочной характеристики . . . 10
8.3 СВЭЖХ-ВПМС/МС измерение . . . 10
9 Обработка результатов измерений . . . 11
10 Метрологические характеристики . . . 11
11 Оформление результатов измерений . . . 12
12 Контроль стабильности результатов измерений . . . 12

ОКС 67.120.30

Поправка к ГОСТ Р 56962—2016 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Пункт 4.5	- температура окружающего воздуха . . . . . от 20 ºС до 30 ºС;	- температура окружающего воздуха . . . от 15 ºС до 30 ºС;
	- напряжение в питающей электросети. . . . . от 200 до 240 В;	—
	- частота переменного тока . . . от 49 до 51 Гц;	—
	- относительная влажность воздуха . . . от 40 % до 80 %.	- относительная влажность воздуха . . . от 20 % до 80 %.

(ИУС № 7 2017 г.)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РЫБА, НЕРЫБНЫЕ ОБЪЕКТЫ И ПРОДУКЦИЯ ИЗ НИХ

Метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения

Fish, non-fish objects and products from them. Method for determination of residual content of triphenylmethane dyes using ultra performance liquid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на рыбу, нерыбные объекты (ракообразные, моллюски) и продукцию из них и устанавливает метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения (далее — СВЭЖХ-ВПМС/МС) для определения остаточного содержания трифенилметановых красителей в диапазоне измерений от 0,5 до 6,0 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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 OIML R 76—1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3652—69 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

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

ГОСТ 5848—73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 10873—73 Аммоний сернокислый (сульфат аммония) очищенный. Технические условия

ГОСТ 22300—76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

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

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

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

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному 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 заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Количественное определение остаточного содержания трифенилметановых красителей (аналитов) измеряют методом внутреннего стандарта по площадям пиков идентифицированных соединений с помощью градуировочной характеристики сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM).

4 Требования безопасности и условия выполнения измерений

4.1 Применяемые в работе реактивы относятся к веществам 1-го и 2-го класса опасности по ГОСТ 12.1.007, при работе с ними необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

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

4.3 Приготовление градуировочных растворов проводят в вытяжном шкафу.

4.4 К выполнению измерений методом СВЭЖХ-ВПМС/МС допускаются лица, владеющие техникой СВЭЖХ-ВПМС/МС и изучившие инструкции по эксплуатации применяемой аппаратуры

4.5 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . от 20 °С до 30 °С;
- атмосферное давление . . . . . от 84 до 106 кПа;
- напряжение в питающей электросети . . . . . от 200 до 240 В;
- частота переменного тока . . . . . от 49 до 51 Гц;
- относительная влажность воздуха . . . . . от 40 % до 80 %.

5 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы

5.1 Для определения остаточного содержания трифенилметановых красителей применяют следующие средства измерений, аппаратуру, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности ± 0,001 г;
- весы микроаналитические с наибольшим пределом взвешивания 80 г, с пределом абсолютной допускаемой погрешности не более ± 0,01 мг;
- масс-спектрометр с времяпролетным детектором высокого разрешения и диапазоном измерений от 50 до 3000 атомных единиц массы (а. е. м.), массовым разрешением не менее 3000 а. е. м., точностью измерения массы не менее 0,5 а. е. м., с режимом получения фрагментных ионов (режим МС/МС);
- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 дм^3;
- встряхиватель (шейкер) вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2500 об/мин;
- встряхиватель (шейкер) переворачивающий орбитального типа с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об/мин;
- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;
- камеру лабораторную морозильную с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 20 °С до минус 40 °С;

- колонку хроматографическую длиной 50 мм и диаметром 1 мм с гибридным обращеннофазным сорбентом, диаметром частиц сорбента не более 1,7 мкм;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;
- систему сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографическую, состоящую из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до (30 ± 1) °С;
- систему получения деионизованной воды высокой чистоты;
- систему упаривания растворителей, обеспечивающую поддержание температуры не менее 50 °С;
- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 5 °С;
- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 4750 об/мин и диапазоном температур от 4 °С до 25 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 $см^3$ и микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 $см^3$;
- шкаф сушильный лабораторный с рабочим диапазоном температур от 50 °С до 200 °С;
- картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 $см^3$, заполненные 60 мг сбалансированного гидрофильно-липофильного обращеннофазного сорбента с размером частиц от 30 до 60 мкм;
- пробы, не содержащие трифенилметановых красителей, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, («чистые» пробы)[1];
- фильтры нейлоновые мембранные с размером диаметра пор не более 0,2 мкм;
- виалы (флаконы) для автоматического устройства ввода проб вместимостью 2 $см^3$ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм;
- колбы 1-10(50, 500, 1000, 2000)-1 по ГОСТ 1770;
- колбы конические Кн—1—500—29/32 ТС по ГОСТ 25336;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 5—25 $мм^3$, 20—100 $мм^3$, 200—1000 $мм^3$, 500—5000 $мм^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ±1 %;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 $см^3$, 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками;
- шприцы одноразовые вместимостью 2 $см^3$;
- цилиндры 1-25 (50, 100, 250, 500,1000)-1 по ГОСТ 1770.

5.2 При определении остаточного содержания трифенилметановых красителей применяют следующие реактивы:

- аммония сульфат по ГОСТ 10873;
- ацетон по ГОСТ 2603;
- ацетонитрил для ВЭЖХ-МС с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- 2,3-дихлоро-5,6-дициано-пара-бензохинон (ДДБ) с массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- дихлорметан с массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- кислоту лимонную по ГОСТ 3652;
- кислоту муравьиную по ГОСТ 5848, ч.д.а.;
- метанол по ГОСТ 6995, х. ч.;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 4172;
- н-гексан, х. ч.;
- хлоранил с массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- этилацетат по ГОСТ 22300, ч.д.а.;
- воду деионизованную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709.

5.3 При определении остаточного содержания трифенилметановых красителей в качестве образцов сравнения применяют следующие соединения:

1) Для приготовления исходных растворов с массовой долей основного вещества:

- малахитовый зеленый — не менее 98 %;
- кристаллический фиолетовый — не менее 90 %;
- бриллиантовый зеленый — не менее 90 %.

---

[1] Срок хранения «чистых» проб при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С — не более трех мес.

2) Для приготовления исходных растворов внутренних стандартов с массовой долей основного вещества:

- малахитовый зеленый-*D*5 — не менее 95 %;
- кристаллический фиолетовый-*D*6 — не менее 95 %.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов

6.1.1 Мойку и сушку посуды проводят в отдельном помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией. Для сушки лабораторной посуды и подготовки реактивов используют отдельные сушильные шкафы. Не допускается проведение подготовки посуды в данном помещении для других видов анализов.

6.1.2 Стеклянную посуду подвергают стандартной процедуре очистки лабораторной посуды с последующей последовательной промывкой органическими растворителями: этилацетатом (однократно), ацетоном (дважды).

6.1.3 Процедуру промывки органическими растворителями следует проводить в вытяжном шкафу. Рекомендуется на стадиях промывки использовать ультразвуковую баню. Окончательную сушку посуды проводят в сушильном шкафу, установленном в вытяжном шкафу, при температуре от 105 °С до 110 °С.

6.1.4 Каждую новую партию реактивов проверяют на отсутствие контаминации анализируемыми соединениями путем проведения анализа холостой пробы.

6.2 Приготовление растворов

6.2.1 Приготовление подвижных фаз А и Б

6.2.1.1 Для приготовления подвижной фазы А в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 999 см^3 деионизованной воды, добавляют 1 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.2.1.2 Для приготовления подвижной фазы Б в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 500 см^3 ацетонитрила, 500 см^3 метанола, добавляют 1 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 6 мес.

6.2.2 Приготовление раствора лимонной кислоты с молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 19,212 г лимонной кислоты, доливают порциями деионизованную воду, тщательно перемешивают и доводят объем до метки деионизованной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 недели.

6.2.3 Приготовление раствора натрия фосфорнокислого двузамещенного с молярной концентрацией 0,2 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 2000 см^3 вносят 56,796 г натрия фосфорнокислого двузамещенного, доливают порциями деионизованную воду, тщательно перемешивают и доводят объем до метки деионизованной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 недели.

6.2.4 Приготовление буферного раствора

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 891 см^3 раствора лимонной кислоты (см. 6.2.2) и 109 см^3 раствора натрия фосфорнокислого двузамещенного (см. 6.2.3), перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

6.2.5 Приготовление раствора для экстракции

В колбу вместимостью 500 см^3 вносят 250 см^3 буферного раствора (см. 6.2.4) и 250 см^3 ацетонитрила, перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

6.2.6 Приготовление раствора хлоранила с молярной концентрацией 0,001 моль/дм^3

В мерной колбе вместимостью 50 см^3 взвешивают 12,2 мг хлоранила, наливают ацетонитрил до метки и перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 недели.

6.2.7 Приготовление раствора ДДБ с молярной концентрацией 0,001 моль/дм^3

В мерной колбе вместимостью 50 см^3 взвешивают 11,35 мг ДДБ, наливают ацетонитрил до метки и перемешивают.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 недели.

6.2.8 Приготовление вспомогательных растворов (ВР)

6.2.8.1 Приготовление ВР муравьиной кислоты в деионизованной воде в объемном соотношении 1:19 (ВР1)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 2,5 см^3 муравьиной кислоты и 47,5 см^3 деионизованной воды, перемешивают.

6.2.8.2 Приготовление ВР метанола, муравьиной кислоты в деионизованной воде в объемном соотношении 1:1:18 (ВР2)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 2,5 см^3 метанола, 2,5 см^3 муравьиной кислоты и 45 см^3 деионизованной воды, перемешивают.

6.2.8.3 Приготовление ВР метанола, муравьиной кислоты в деионизованной воде в объемном соотношении 10:1:9 (ВР3)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 25 см^3 метанола, 2,5 см^3 муравьиной кислоты и 22,5 см^3 деионизованной воды, перемешивают.

6.2.8.4 Приготовление ВР этилацетата с гексаном в объемном соотношении 1:1 (ВР4)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 25 см^3 этилацетата и 25 см^3 гексана, перемешивают.

6.2.8.5 Приготовление ВР этилацетата, метанола и муравьиной кислоты в объемном соотношении 500:500:1 (ВР5)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 25 см^3 этилацетата, 25 см^3 метанола и 0,05 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

6.2.8.6 Приготовление ВР метанола, деионизованной воды и муравьиной кислоты в соотношении 400:599:1 (ВР6)

В полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3 вносят 20 см^3 метанола, 30 см^3 деионизованной воды и 0,05 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают.

Срок хранения вспомогательных растворов при комнатной температуре — не более 1 недели.

6.3 Приготовление градуировочных растворов

6.3.1 Приготовление исходных растворов C_0 трифенилметановых красителей

Для приготовления исходных растворов (C_0) концентрацией 500 мкг/см^3 рассчитывают навеску, эквивалентную 5,0 мг малахитового зеленого, кристаллического фиолетового, бриллиантового зеленого, исходя из массовой доли в исходном веществе по формуле (1), после чего переносят каждое вещество по отдельности в мерные колбы вместимостью 10 см^3. Доводят до метки метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

$$m = m_0 \frac{M_0 \cdot 100\,\%}{M \cdot c}. \qquad (1)$$

где m_0 — масса основного вещества, г (m_0 = 10 г);

M_0 — молярная масса соли анализируемого соединения (для анализируемых соединений, растворы которых готовят из солей), г/моль;

M — молярная масса анализируемого соединения, г/моль;

c — массовая доля анализируемого соединения (или его соли) в исходном веществе, %.

Срок хранения растворов при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С — не более одного года.

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.2 Приготовление рабочих растворов C_1, C_2

Рабочие растворы C_1, C_2 готовят в мерных колбах вместимостью 10 см^3 согласно рисунку 1.

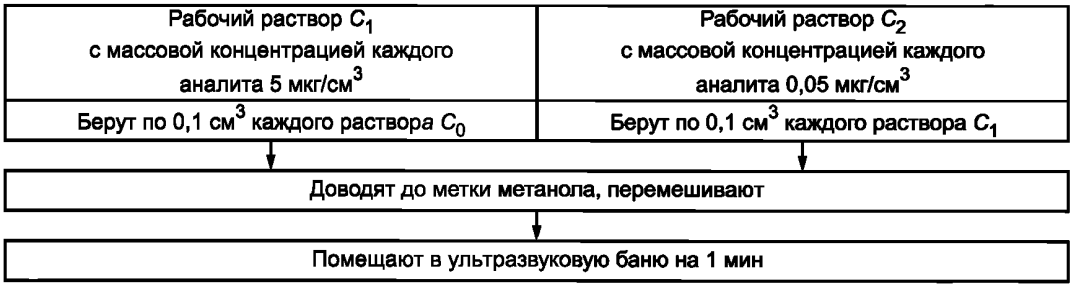

Рисунок 1 — Приготовление рабочих растворов C_1, C_2

Растворы C_1, C_2 хранят при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С. Срок хранения раствора C_1 — не более одного года, C_2 — не более 6 мес.

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.3 Приготовление исходных растворов D_0 внутренних стандартов

Для приготовления исходных растворов внутренних стандартов D_0 концентрацией 500 мкг/см^3 взвешивают по 5,0 мг малахитового зеленого-*D*5, кристаллического фиолетового-*D*6 и переносят каждое вещество по отдельности в мерные колбы вместимостью 10 см^3. Доводят до метки метанолом, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 1 мин.

Срок хранения растворов при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С — не более одного года.

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

Внутренние стандарты для трифенилметановых красителей выбирают в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Соответствие между аналитами и внутренними стандартами

Наименование аналита	Наименование внутреннего стандарта
Малахитовый зеленый	Малахитовый зеленый-*D*5
Кристаллический фиолетовый	Кристаллический фиолетовый-*D*6
Бриллиантовый зеленый	

6.3.4 Приготовление рабочих растворов внутренних стандартов D_1, D_2

Рабочие растворы D_1, D_2 готовят в мерных колбах вместимостью 10 см^3 согласно рисунку 2.

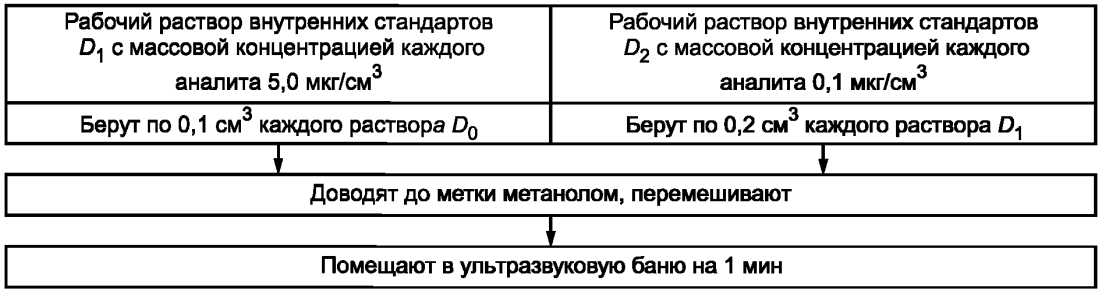

Рисунок 2 — Приготовление рабочих растворов внутренних стандартов D_1, D_2

Растворы D_1, D_2 хранят при температуре от минус 30 °С до минус 40 °С. Срок хранения раствора D_1 — не более одного года, D_2 — не более 3 мес.

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.5 Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_6

Матричные градуировочные растворы G_1—G_6 готовят в полипропиленовых пробирках вместимостью 15 см^3 из «чистых» проб массой 1,0 г, в которые вносят рабочий раствор внутренних стандартов D_2 и рабочий раствор определяемых аналитов C_2 в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_6

Обозначение и массовая концентрация приготовляемого матричного градуировочного раствора	Вносимый объем рабочего раствора, см^3	
	C_2	D_2
G_1 (8 нг/см^3)	0,16	0,05
G_2 (6 нг/см^3)	0,12	0,05
G_3 (4 нг/см^3)	0,08	0,05
G_4 (2 нг/см^3)	0,04	0,05
G_5 (1 нг/см^3)	0,02	0,05
G_6 (0,5 нг/см^3)	0,01	0,05

Пробирки встряхивают в шейкере 1 мин и проводят обработку пробы согласно разделу 7.

Растворы G_1—G_6 используют свежеприготовленными.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб рыбы, нерыбных объектов (ракообразные, моллюски) и продукции из них — по ГОСТ 31339.

7.1.2 Пробы, отобранные по 7.1.1, при отсутствии возможности анализа в день отбора замораживают и хранят при температуре минус 18 °С до проведения анализа, но не более 90 сут.

7.2 Подготовка проб

7.2.1 Экстракция и обезжиривание проб

Пробу предварительно очищают от грубой соединительной ткани, хитина, других нецелевых составляющих и измельчают на гомогенизаторе. Далее обработку пробы проводят в соответствии с рисунком 3.

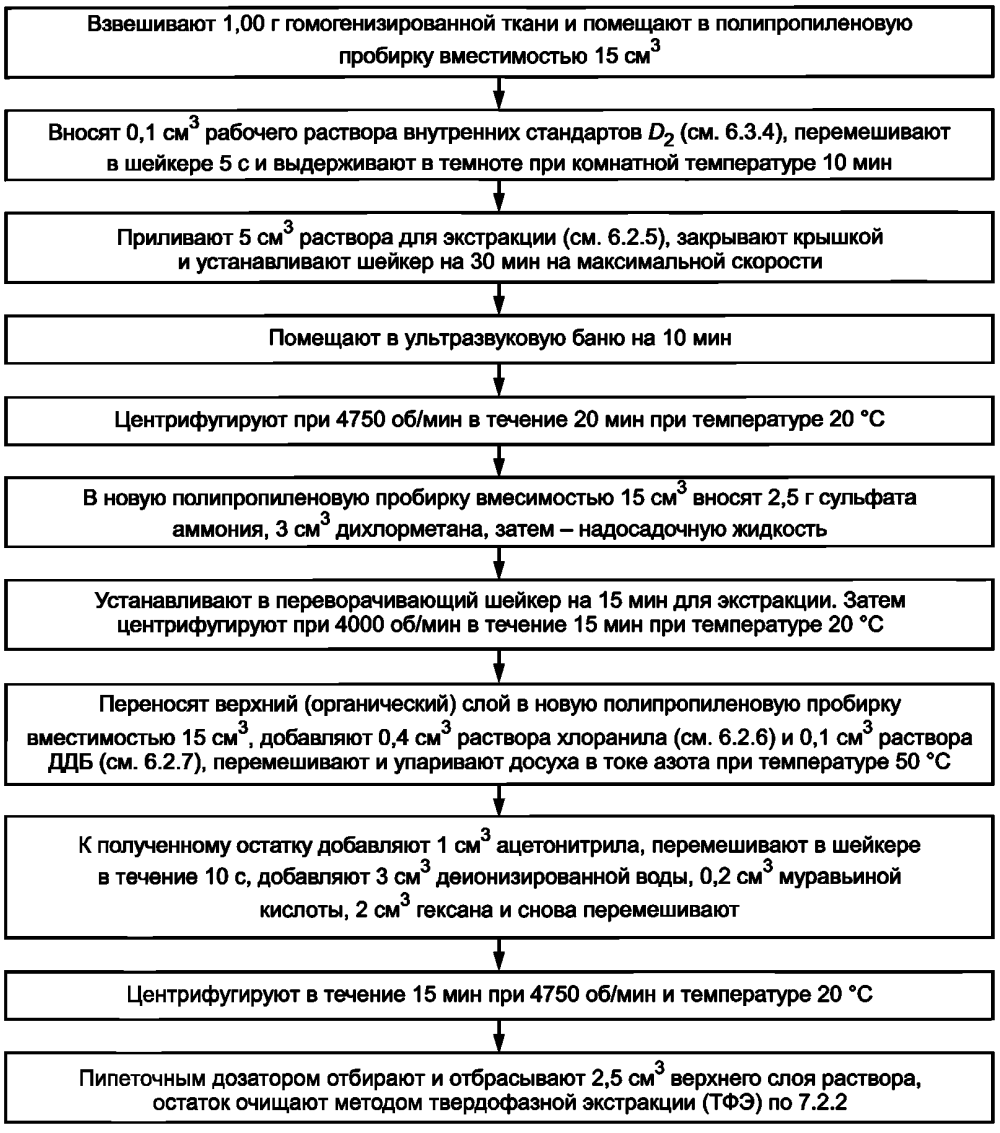

Рисунок 3 — Экстракция и обезжиривание проб

7.2.2 Очистка подготовленных проб методом ТФЭ

Картриджи для твердофазной экстракции кондиционируют на вакуумном устройстве для ТФЭ, пропуская 2 см^3 метанола и 2 см^3 вспомогательного раствора ВР1 (см. 6.2.8.1). Затем пропускают через картридж пробу, полученную в соответствии с 7.2.1, промывают картридж, последовательно пропуская вспомогательные растворы по 3 см^3: ВР2 (см. 6.2.8.2), ВР3 (см. 6.2.8.3), ВР4 (см. 6.2.8.4), и сушат его в вакууме водоструйного насоса 2 мин. Элюируют определяемые вещества в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см^3 с помощью 3 см^3 вспомогательного раствора ВР5 (см. 6.2.8.5). Упаривают элюат досуха в токе азота при температуре 50 °С. Остаток растворяют в 1 см^3 вспомогательного раствора ВР6 (см. 6.2.8.6), перемешивают в шейкере, помещают в ультразвуковую баню при комнатной температуре на 2 мин и снова перемешивают в шейкере. Раствор фильтруют шприцем через мембранный фильтр в виалу вместимостью 2 см^3 и используют для СВЭЖХ-ВПМС/МС анализа.

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия хроматографических измерений

8.1.1 Масс-спектрометр с времяпролетным детектором высокого разрешения включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры, рекомендуемые

изготовителем хроматографических колонок. Например, для колонки диаметром 1 мм, длиной 50 мм, с гибридным обращеннофазным сорбентом с размером частиц 1,7 мкм, применяют следующие хроматографические условия:

- температура колонки — 30 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,1 см^3/мин;
- объем вводимой пробы — 10 мм^3;
- температура в отсеке устройства ввода проб — 20 °С.

8.1.2 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление растворов элюентов по 6.2.1) в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 — Условия хроматографического разделения

Время, мин	Подвижная фаза «А», %	Подвижная фаза «Б»,%
0,0	100	—
1,0	100	—
1,1	50	50
7,0	10	90
10,0	10	90
10,1	100	—
16,0	100	—

8.1.3 Параметры воздействия на ионы в режиме мониторинга нескольких реакций (*MRM*) приведены в таблице 4.

Таблица 4 — Параметры воздействия на ионы в режиме *MRM* и условиях электрораспыления

Наименование аналита	Ион-предшественник, *m*/z	Ион-продукт, *m*/z		Время удерживания, мин	Энергия соударений, эВ
Малахитовый зеленый	329,205	313,173	284,142	3,40	55
Малахитовый зеленый-*D*5	335,237	318,204	246,134	3,14	55
Кристаллический фиолетовый	372,247	356,215	340,183	3,70	60
Кристаллический фиолетовый-*D*6	378,285	362,252	346,220	3,70	60
Бриллиантовый зеленый	385,268	341,204	297,140	4,24	60

Примечание — Приведенные выше параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования могут отличаться в зависимости от используемой аппаратуры.

8.1.4 Параметры настройки времяпролетного масс-спектрометрического детектора:

- напряжение в источнике — 500 В;
- напряжение на распыляющем капилляре — 4500 В;
- давление азота в распылителе — 300 кПа;
- скорость газа осушения — 8 дм^3/мин;
- температура газа осушения — 200 °С;
- высокочастотное напряжение на воронке — 400 В;
- амплитуда напряжения ВЧ — 400 В;
- амплитуда напряжения ВЧ ячейки соударений — 550 В.

Параметры источника электрораспыления приведены в таблице 5.

Таблица 5 — Параметры источника электрораспыления

Временной интервал (мин)	Амплитуда напряжения ВЧ охладителя ионов (Vpp)	Время транспортирования (μs)	Время накопления ионов (μs)	Скорость сканирования/режим сканирования
0,50—3,45	80	35	15	2,5 Гц/MRM
3,45—10,00	120	35	15	3,0 Гц/MRM
14,00—15,50	50	50	10	1,0 Гц/MS

8.1.5 Контроль чувствительности масс-спектрометра осуществляют введением 10 мм^3 градуировочного раствора G_3 (см. 6.3.5) в инжектор хроматографа. Полученное соотношение сигнал/шум для каждого аналита должно быть не менее 50.

8.2 Построение градуировочной характеристики

Построение и расчет градуировочной характеристики проводят методом внутреннего стандарта в каждой серии анализов с помощью программного обеспечения масс-спектрометра в автоматическом режиме.

8.2.1 Проводят измерения не менее трех градуировочных растворов, приготовленных по 6.3.5, в порядке возрастания их концентраций.

8.2.2 В целях контроля стабильности градуировочной характеристики вместе с градуировочными растворами проводят дополительное измерение «чистой» пробы с добавкой трифенилметановых красителей на градуировочном уровне G_5.

8.2.3 Вычисление площади пика проводят для наиболее интенсивного дочернего иона анализируемых трифенилметановых красителей и их внутренних стандартов. Для подтверждения наличия трифенилметановых красителей рассчитывают отношения площади пика двух дочерних ионов для каждого аналита в градуировочном растворе.

8.2.4 При построении градуировочной характеристики используют линейную регрессию вида $y = ax$, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

8.2.5 Построение линейного градуировочного графика и расчет концентрации трифенилметановых красителей в анализируемых пробах выполняется системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.3 СВЭЖХ-ВПМС/МС-измерение

8.3.1 Для определения остаточного содержания трифенилметановых красителей проводят СВЭЖХ-ВПМС/МС-анализ в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования в условиях хроматографических измерений с параметрами, указанными в 8.1.

8.3.2 СВЭЖХ-ВПМС/МС-анализ выполняют в виде серии измерений, включающей следующие образцы:

- экстракты «чистых» проб, приготовленных по 7.2;
- градуировочные растворы (см. 6.3.5);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

8.3.3 В инжектор хроматографа вводят 10 мм^3 пробы, подготовленной в соответствии с разделом 7, и проводят измерения в условиях, используемых при установлении градуировочной зависимости.

8.3.4 Отклонения относительных ионных интенсивностей в анализируемой пробе от относительных ионных интенсивностей, полученных при анализе градуировочных растворов, не должны превышать значений, указанных в таблице 6.

Таблица 6 — Допустимые отклонения относительных ионных интенсивностей

Относительная ионная интенсивность, % от основного пика	Максимально допустимые отклонения для СВЭЖХ-МС/МС-детектирования, %
Св. 50	±25
Св. 20 до 50 включ.	±30
Св. 10 до 20 включ.	±35
Менее 10	±50

9 Обработка результатов измерений

9.1 В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, проводят обработку хроматограмм с использованием программного обеспечения, получая значения концентрации аналитов в анализируемой пробе.

9.2 Содержание i-го аналита X_i, мкг/кг, вычисляют по формуле

$$X_i = \frac{C_i \cdot V_i}{m_i}, \quad (2)$$

где C_i — концентрация аналита в анализируемой пробе, найденная по градуировочному графику, нг/см^3;

V_i — объем, до которого разбавлена проба, см^3;

m_i — масса анализируемой пробы, г.

9.3 За окончательный результат содержания трифенилметановых красителей принимают среднеарифметическое значение результатов вычислений двух параллельных измерений, выполненных в условиях повторяемости, округленное до первого десятичного знака и выраженное в микрограммах на килограмм (мкг/кг).

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений содержания трифенилметановых красителей с расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата k = 2, указанной в таблице 7.

Таблица 7 — Показатели точности метода при определении содержания трифенилметановых красителей

Наименование аналита	Диапазон измерений содержания аналита, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности $\pm U$ при коэффициенте охвата k = 2, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σr, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σR, %	Предел повторяемости r ,% (при P = 0,95, n = 2)
Малахитовый зеленый	От 0,5 до 1,0 включ.	83	13	40	36
	Св.1,0 до 2,0 включ.	55	10	27	28
	Св. 2,0 до 6,0 включ.	28	6	12	14
Бриллиантовый зеленый	От 0,5 до 2,0 включ.	70	26	33	72
	Св. 2,0 до 4,0 включ.	33	10	15	28
	Св. 4,0 до 6,0 включ	23	6	9	17
Кристаллический фиолетовый	От 0,5 до 1,0 включ.	80	32	46	73
	Св.1,0 до 2,0 включ.	55	14	26	39
	Св. 2,0 до 4,0 включ.	34	11	15	31
	Св. 4,0 до 6,0 включ	24	5	10	14

11 Оформление результатов измерений

Содержание i-го трифенилметанового красителя, мкг/кг, представляют в виде

$$\overline{X}_i \pm 0{,}01 \cdot U_i \cdot \overline{X}_i, \quad (3)$$

где X_i — среднеарифметическое значение вычислений двух параллельных измерений содержания i-го аналита в анализируемой пробе по 9.2, мкг/кг;

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания i-го аналита для соответствующего диапазона измерений, % (в соответствии с таблицей 7).

12 Контроль стабильности результатов измерений

Контроль стабильности результатов измерений в пределах лаборатории осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6 с использованием контрольных карт Шухарта.

УДК 639.38:614.31:543.062:006.351 ОКС 67.120.30

Ключевые слова: рыба, нерыбные объекты, остаточное содержание, трифенилметановые красители, сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения, малахитовый зеленый, лейкомалахитовый зеленый, кристаллический фиолетовый, бриллиантовый зеленый

Редактор *Н.Н. Мигунова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 05.07.2016. Подписано в печать 08.08.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,48. Тираж 31 экз. Зак. 1841.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru