
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО
13493—
2005

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения содержания хлорамфеникола (левомецетина) с помощью жидкостной хроматографии

ISO 13493:1998

Meat and meat products — Determination of chloramphenicol content —
Method using liquid chromatography
(IDT)

Издание официальное

БЗ 12—2005/348



Москва
Стандартинформ
2006

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГУ ВНИИПП Россельхозакадемии) на основе собственно аутентичного перевода, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 116 «Продукты переработки птицы, яиц и сублимационной сушки»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 16 декабря 2005 г. № 314-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 13493:1998 «Мясо и мясные продукты. Определение содержания хлорамфеникола. Метод жидкостной хроматографии» (ISO 13493:1998 «Meat and meat products — Determination of chloramphenicol content — Method using liquid chromatography»). Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2004 (пункт 3.5).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных (региональных) стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации, сведения о которых приведены в дополнительном приложении Б

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет

© Стандартиформ, 2006

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

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ**Метод определения содержания хлорамфеникола
(левомицетина) с помощью жидкостной хроматографии**

Meat and meat products.

Method for determination of chloramphenicol content using liquid chromatography

Дата введения — 2007—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения с помощью жидкостной хроматографии содержания хлорамфеникола в мышечной ткани мяса, включая мясо птицы, где массовая доля хлорамфеникола составляет не менее 6,5 мкг/кг.

Данный метод неприменим к испорченным образцам.

Примечание — Настоящий стандарт допускается применять для определения содержания хлорамфеникола во всех видах мяса и мясопродуктов. Однако межлабораторные испытания по установлению точности метода были проведены только на образцах мышечной ткани.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ИСО 3100-1:1991 Мясо и мясные продукты. Методы отбора и подготовки образцов. Часть 1. Отбор образцов

ИСО 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний

ИСО 5725-1:1994 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

Часть 1. Основные положения и определения

ИСО 5725-2:1994 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующий термин с соответствующим определением:

3.1 содержание хлорамфеникола в мясе и мясных продуктах: Массовая доля хлорамфеникола, измеренная с помощью метода, установленного в настоящем стандарте.

Примечание — Содержание хлорамфеникола выражают в микрограммах на килограмм.

4 Сущность метода

Хлорамфеникол из пробы экстрагируют водой. Экстракт фильтруют и полученный водный раствор очищают от липофильных компонентов методом твердофазной экстракции. Хлорамфеникол элюируют с экстракционного патрона дихлорметаном. Органический растворитель выпаривают и остаток очищают с помощью жидко-жидкостной экстракции в системе вода-толуол. Хлорамфеникол определяют методом обращенно-фазной хроматографии с детектированием в ультрафиолетовой (УФ) области спектра.

5 Реактивы

При отсутствии специальных указаний используют реактивы только признанных аналитических марок.

5.1 Вода должна соответствовать требованиям квалификации не ниже 3-й степени чистоты согласно ИСО 3696. Вода не должна содержать органические примеси.

5.2 Азот, пригодный для выпаривания растворителей.

5.3 Дихлорметан.

5.4 Тoluол.

5.5 Ацетатный буфер, $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}) = 0,01$ моль/дм³, pH = 4,3.

Растворяют 0,82 г безводного ацетата натрия примерно в 970 см³ воды. С помощью pH-метра (6.1) доводят pH до 4,3 добавлением раствора уксусной кислоты массовой долей 50 %. Переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1000 см³. Доводят водой до метки и перемешивают.

5.6 Ацетонитрил для УФ спектроскопии.

5.7 Подвижная фаза.

K 250 см³ ацетонитрила (5.6) добавляют 750 см³ ацетатного буфера (5.5) и тщательно перемешивают.

Перед использованием элюент фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм (6.2) и дегазируют.

5.8 Основной раствор хлорамфеникола массовой концентрации 100 мкг/см³.

Взвешивают 10 мг хлорамфеникола с точностью 0,1 мг и переносят навеску в мерную колбу вместимостью 100 см³. Добавляют метанол до метки и перемешивают.

Приготовленный основной раствор стабилен в течение 1 мес при хранении в темноте.

5.9 Стандартные растворы хлорамфеникола.

Пипеткой вносят 5,0 см³ основного раствора (5.8) в мерную колбу вместимостью 100 см³. Разбавляют водой до метки и перемешивают. Разбавляют 1,0, 2,0, 5,0 и 15,0 см³ этого раствора до 100 см³ для получения четырех стандартных растворов с массовой концентрацией хлорамфеникола соответственно 0,05; 0,10; 0,25 и 0,75 мкг/см³.

Эти стандартные растворы стабильны в течение одной недели при хранении в темноте.

6 Оборудование

Используют обычное лабораторное оборудование, в частности:

6.1 pH-метр

6.2 Мембранный фильтр с малым мертвым объемом и размером пор 0,22 мкм.

6.3 Механическое или электрическое устройство, пригодное для измельчения образца.

В качестве такого устройства может быть использован высокоскоростной ротационный куттер или мясорубка с решеткой, диаметр отверстий которой не превышает 4 мм.

6.4 Лабораторный гомогенизатор (например гомогенизатор типа Стомахер или Вортекс)¹⁾.

6.5 Фильтровальная бумага обеззоленная быстрофильтрующая диаметром примерно 15 см.

Примечание — Например, можно использовать Ватман 41¹⁾.

6.6 Экстракционные патроны вместимостью 20 см³ с диатомитовой землей, которая задерживает липофильные компоненты из водных растворов.

Примечание — Можно использовать, например, картриджи Extrelut® производства фирмы Merck, Дармштадт, Германия (№ 11737)¹⁾.

6.7 Водяная баня или нагревательный блок, позволяющие поддерживать температуру (40 ± 1) °C и имеющие устройство для выпаривания потоком азота (5.2), или ротационный вакуумный испаритель.

6.8 Центрифужные пробирки вместимостью 25 см³.

6.9 Смеситель для пробирок типа Вортекс, обеспечивающий частоту вращения примерно 700 мин⁻¹.

6.10 Центрифуга, обеспечивающая радиальное ускорение примерно 1000 g.

6.11 Микропипетки вместимостью 300 мм³.

¹⁾ Это примеры коммерчески доступной продукции. Данная информация приведена только для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой этой продукции.

6.12 Жидкостной хроматограф, оборудованный:

- насосом постоянного потока;
- инжектором;
- хроматографической колонкой внутренним диаметром 3 мм, длиной 20 см, заполненную обращенной фазой C_8 или C_{18} с размером частиц 5 мкм, или другой колонкой с эквивалентными характеристиками;
- детектором УФ/ВИД, обеспечивающим измерение при длине волны 285 нм, если возможно — диодно-матричный детектором (используется для подтверждения обнаружения хлорамфеникола);
- самописцем с регулируемым диапазоном измерения или интегратором.

7 Отбор образцов

Отбор образцов не является частью метода, изложенного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора образцов приведен в ИСО 3100-1.

Очень важно, чтобы в лабораторию поступали представительные образцы, которые в процессе хранения и транспортирования не были испорчены или изменены.

От представительного образца, поступившего в лабораторию, отбирают для анализа образец массой не менее 200 г. Образец хранят в условиях, исключающих его порчу и изменение состава.

8 Подготовка образца

Доводят температуру образца до комнатной температуры. Удаляют жировую ткань и несъедобные части образца.

Измельчают образец с помощью устройства (6.3). При этом необходимо следить за тем, чтобы температура образца не превышала 25 °С. При использовании мясорубки образец пропускают через нее не менее двух раз.

Приготовленный образец помещают в герметично закрываемую емкость. Закрывают и хранят так, чтобы не допустить порчи и изменения его состава.

В случае необходимости образец хранят при температуре ниже минус 18 °С.

Анализ образца проводят как можно быстрее, но не позднее 24 ч после измельчения.

9 Проведение испытаний

П р и м е ч а н и е — Для контроля повторяемости результатов (см. 11.2) проводят два параллельных определения в соответствии с 9.1—9.6.

9.1 Общая часть

Параллельно с анализом раствора (или серии растворов), полученного из испытуемого образца, проводят анализ раствора, полученного из образца, заведомо не содержащего хлорамфеникол (образец-бланк), и раствора, полученного из образца, в который добавлен хлорамфеникол в количестве 10 мкг/кг (образец-бланк с внесенным хлорамфениколом).

9.2 Подготовка пробы

В конической колбе вместимостью 100 см³ взвешивают 10 г (*m*) измельченного образца (8) с точностью 0,1 г.

9.3 Получение экстракта

Добавляют 40,0 см³ воды и энергично перемешивают в течение 3 мин с помощью лабораторного гомогенизатора (6.4).

Общий объем образующейся водной фазы (V_1) равен 40,0 см³ плюс объем воды, содержащейся в пробе (обычно в 10 г пробы содержится примерно 7,5 см³ воды).

Гомогенат фильтруют через бумажный фильтр (5).

9.4 Твердофазная экстракция

Переносят 20,0 см³ фильтрата (V_2) в экстракционный патрон (6.6).

Через (15 ± 2) мин элюируют хлорамфеникол с помощью 70 см³ дихлорметана (5.3). Выпаривают органическую фазу до объема примерно 1 см³ на водяной бане (6.7) в слабом потоке азота (5.2) или с помощью ротационного вакуумного испарителя (6.7).

С помощью примерно 10 см³ дихлорметана (5.3) переносят остаток в центрифужную пробирку (6.8). Осторожно выпаривают досуха.

9.5 Жидко-жидкостная экстракция

К остатку добавляют 400 мм³ воды (V_3) и 2,0 см³ толуола (5.4) и перемешивают с умеренной интенсивностью в течение 1 мин на смесителе Вортекс (6.9) с частотой вращения примерно 700 мин⁻¹.

Центрифугируют в течение 5 мин на центрифуге (6.10) с радиальным ускорением 1000 g.

Пипеткой отбирают как можно больше органической фазы и отбрасывают ее.

Добавляют 1,5 см³ толуола и перемешивают с умеренной интенсивностью в течение 1 мин на смесителе Вортекс (6.9) с частотой вращения примерно 700 мин⁻¹.

Центрифугируют в течение 5 мин на центрифуге (6.10) с радиальным ускорением 1000 g.

Пипеткой отбирают как можно больше органической фазы и отбрасывают ее.

Микропипеткой (6.11) переносят 300 мм³ водной фазы в подходящий сосуд.

9.6 Хроматографический анализ**9.6.1 Условия хроматографирования**

Параметр	Значение
Длина волны	285 нм
Диапазон шкалы детектора	от 0,005 до 0,010 единиц оптической плотности, что соответствует полной шкале самописца
Шкала самописца	10 мВ
Скорость бумаги самописца	1,0 см/мин
Объемная скорость потока подвижной фазы (5.7)	0,6 см ³ /мин
Объем анализируемого раствора, вводимый (инжектируемый) в хроматограф	100 мм ³

Примечание — Инжектируемый объем и объемная скорость потока зависят от размеров колонки.

9.6.2 Хроматографирование

После стабилизации системы жидкостного хроматографа (6.12) инжектируют растворы, полученные из образца-бланка и образца-бланка с внесенным хлорамфениколом, четыре стандартных раствора хлорамфеникола (5.9), раствор, приготовленный из испытуемого образца по 9.5, и снова стандартные растворы хлорамфеникола (5.9).

На хроматограммах образцов проверяют наличие сигнала на участке, соответствующем времени удерживания хлорамфеникола.

9.6.3 Измерение

Измеряют высоты или площади хроматографических пиков хлорамфеникола для испытуемого раствора и стандартных растворов хлорамфеникола.

Измеренные для стандартных растворов высоты или площади пиков должны линейно зависеть от содержания хлорамфеникола в этих растворах.

Примечание — С помощью диодно-матричного детектора может быть подтверждено обнаружение хлорамфеникола при его содержании в образце более 10 мкг/кг.

10 Обработка результатов измерений

Содержание хлорамфеникола w , мкг/кг, в испытуемом образце рассчитывают по формуле

$$w = \frac{h \rho V_1 V_3}{h_s m V_2},$$

где h — высота или площадь пика в единицах длины или площади, измеренные для испытуемого раствора;

h_s — высота или площадь пика, измеренные для одного из стандартных растворов (5.9);

ρ — содержание хлорамфеникола в стандартном растворе, мкг/см³;

m — масса испытуемой пробы (9.2), г;

V_1 — объем водной фазы, полученной после гомогенизации по 9.3, см³ ($V_1 = 40 \text{ см}^3 + \text{объем воды в пробе, взятая на испытание}$);

V_2 — объем фильтрата ($V_2 = 20 \text{ см}^3$), перенесенного по 9.4 в экстракционный патрон, см^3 ;

V_3 — объем воды ($V_3 = 400 \text{ мм}^3$), добавленной по 9.5 к сухому остатку, мм^3 .

Результат вычислений округляют до 0,1 мкг/кг.

Результат испытаний нельзя корректировать на открываемость. Открываемость должна быть указана в протоколе испытаний (12).

11 Требования к точности результатов измерений

11.1 Межлабораторные испытания

Точность метода была установлена с помощью межлабораторных испытаний, проведенных в соответствии с ИСО 5725-1 и ИСО 5725-2.

Результаты этой межлабораторной проверки опубликованы в [1]. Результаты этой проверки не могут быть распространены на области концентраций и на матрицы, отличные от указанных в настоящем стандарте.

Результаты другой межлабораторной проверки, приведенной в соответствии с ИСО 5725-1 и ИСО 5725-2, показывают, что открываемость для мяса, мяса птицы и мясных продуктов воспроизводима и равна примерно 55 %.

11.2 Повторяемость

Абсолютное значение разности результатов двух независимых единичных испытаний, выполненных за короткий промежуток времени одним методом для одного измельченного образца в одной лаборатории одним оператором на одном и том же оборудовании, может превышать 2,1 мкг/кг не более чем в 5 % случаев при содержании хлорамфеникола в образце 10 мкг/кг.

11.3 Воспроизводимость

Абсолютное значение разности результатов двух независимых единичных испытаний, выполненных одним методом для идентичного измельченного образца в разных лабораториях разными операторами с использованием разного оборудования, может превышать 4,9 мкг/кг не более чем в 5 % случаев при содержании хлорамфеникола 10 мкг/кг.

12 Протокол испытания

В протоколе испытания необходимо указать:

- информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- использованный метод отбора образцов (если известен);
- использованный метод испытаний с указанием ссылки на настоящий стандарт;
- условия проведения испытаний, не отраженные в настоящем стандарте или считающиеся неоднозначными, а также все имевшие место случаи, которые могут повлиять на результаты испытаний;
- полученный результат испытаний или два результата испытаний, если проводилась проверка повторяемости;
- открываемость.

Приложение А (справочное)

Библиография

[1] Aerts M.L., Keukens H.J., Werdmuller G.A. Liquid Chromatographic Determination of Chloramphenicol Residues in Meat: Interlaboratory Study. J.AOAC, 72, (4), 1989, pp. 570—576

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(обязательное)

**Сведения о соответствии национальных стандартов Российской Федерации
ссылочным международным стандартам**

Обозначение ссылочного международного стандарта	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 3100-1:1991	ГОСТ Р 51447-99 (ИСО 3100-1—91) Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб
ИСО 5725-1:1994	ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения
ИСО 5725-2:1994	ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
ИСО 3696:1987	*
* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.	

УДК 637.544:006.354

ОКС 67.120.10

Н09

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, хлорамфеникол, левомецетин, жидкостная хроматография

Редактор *В.Н. Копысов*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *А.С. Черноусова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 23.12.2005. Подписано в печать 19.01.2006. Формат 60 × 84^{1/8}. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ.л. 0,93. Уч.-изд.л. 0,65. Тираж 208 экз. Зак. 29. С 2353.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Набрано во ФГУП «Стандартинформ» на ПЭВМ.

Отпечатано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.