**ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ (ЕАСС)**

**EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION (EASC)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ**  **СТАНДАРТ** | **ГОСТ 31694-**  *(проект, RU,*  *первая*  *редакция)* |

**ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ**

**Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии**

**с масс-спектрометрическим детектором**

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия*

**Предисловие**

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от № )

За принятие проголосовали:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Краткое наименование  страны по МК  (ИСО 3166) 004–97 | Код страны по МК  (ИСО 3166) 004–97 | Сокращенное наименование  национального органа  по стандартизации |

4 ВВЕДЕН ВЗАМЕН ГОСТ 31694-2012

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты».*

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств

**МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ**

|  |
| --- |
| **ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ**  **Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии**  **с масс-спектрометрическим детектором**    Food products, food raw materials.  Method of determination of the antibiotic residues of tetracycline group by high  performance liquid chromatography – mass spectrometry |

Дата введения —

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты и продовольственное сырье: мясо (все виды животных) и мясные продукты, мясо птицы всех видов и продукты из мяса птицы, субпродукты, рыбу, креветки, молоко (включая сухое и концентрированное молоко) и молочные продукты, яйца и яичные продукты, мед и устанавливает метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС).

Диапазон измерений для демеклоциклина, доксициклина, метациклина, миноциклина, окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина от 1,0 до 1000,0 мкг/кг.

Диапазон измерений для тигециклина – от 10,0 до 1000,0 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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

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

ГОСТ 12.1.018 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

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

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

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы ветиляционные. Общие требования

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

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

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

ГОСТ 4288–76 Изделия кулинарные и полуфабрикаты из рубленого мяса. Правила приемки и методы испытаний

ГОСТ 5848 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6552 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

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

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

ГОСТ 9792 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

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

ГОСТ 19792–2017 Мед натуральный. Технические условия

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

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

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

ГОСТ 31339 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 Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия

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

ГОСТ ИСО 5725-6–2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

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

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов в сети Интернет на официальном сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации ([www.easc.by](http://www.easc.by/)), или в указателях национальных стандартов, издаваемых в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### 3 Сущность метода

Метод основан на извлечении остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы из анализируемой пробы экстрагирующим раствором с последующим определением их методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга выбранных реакций (MRM).

Количественное содержание антибиотиков тетрациклиновой группы рассчитывают по площади пиков идентифицированных соединений, используя градуировочные характеристики, полученные с применением метода внутреннего стандарта.

**4 Требования безопасности и условия выполнения измерений**

4.1 Применяемые в работе реактивы относятся к веществам 1-го и 2-го классов опасности, при работе с ними необходимо соблюдать общие требования безопасности обращения с вредными веществами, установленные ГОСТ 12.1.007. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

4.2 Помещения, в которых проводят измерения и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021 и защищены от действия прямого солнечного или ультрафиолетового излучения.

4.3 Приготовление и использование градуировочных растворов аналитов и их изотопно-меченых аналогов следует проводить в вытяжном шкафу при включенной вентиляции.

4.4 При проведении испытаний соблюдают правила безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением, по ГОСТ 12.2.085.

4.5 При работе с электроприборами следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019, ГОСТ 12.2.007.0, пожаровзрывобезопасности – ГОСТ 12.1.018 и инструкцией по эксплуатации приборов.

4.6 Помещения, в которых проводят измерение и подготовку проб, должны соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и должны быть оснащены средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.7 К выполнению измерений допускают специалистов, прошедших соответствующий инструктаж, владеющих техникой хромато-масс-спектрометрии и изучивших инструкции по эксплуатации используемых приборов.

4.8 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха – от 15 °С до 25 °С;

- относительная влажность воздуха – от 20 % до 80 %.

**5 Средства измерений, вспомогательное оборудование,**

**материалы, посуда и реактивы**

5.1 Для определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности взвешивания не более

± 0,01 г;

- весы специального (I) класса точности с пределами допускаемой погрешности взвешивания не более ± 0,3 мг;

- масс-спектрометр с гибридным квадрупольным анализатором с диапазоном измерений от 5до 1000 атомных единиц массы (а.е.м), массовым разрешением не менее 1,0 а.е.м на полувысоте пика, с погрешностью измерений массы не более ± 0,5 а. е. м, с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС);

- систему высокоэффективной жидкостной хроматографии, оснащенную бинарным насосом со смесителем, термостатом хроматографической колонки, обеспечивающим температуру нагрева до (40 ± 1) °С;

- колонку хроматографическую длиной не более 150 мм, заполненную обращенно-фазовым сорбентом С18 с диаметром частиц не более 5,0 мкм;

- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;

- дозаторы механические одноканальные переменной вместимости   
 10 – 100, 100 – 1000, 500 – 5000 мм3 или по ГОСТ 28311;

- пробы, не содержащие антибиотики тетрациклиновой группы, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, в зависимости от типа исследуемой матрицы («чистые пробы»[[1]](#footnote-1)\*);

- модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и максимальной температурой термостатирования не менее 40 °С;

- микроцентрифугу лабораторную рефрижераторную 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 см3;

- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;

- центрифугу лабораторную рефрижераторную со скоростью вращения не менее 4000 об/мин и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптером для пробирок вместимостью 15 см3;

- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 кГц и объемом не менее 1 дм3;

- встряхиватель (шейкер) вибрационного, ротационного, линейного или орбитального типа для пробирок;

- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;

- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением 18 МОм·см при температуре 20 °С;

- часы электронно-механические по ГОСТ 27752;

- камеру лабораторную морозильную с рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С;

- холодильник бытовой с рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С;

- картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 6 см3, заполненные сорбентом на основе сополимера дивинилбензола и винилпирролидона с диаметром частиц не более 50 мкм, массой 200 мг;

- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 см3 с навинчиваемыми пластмассовыми крышками;

- пробирки полипропиленовые микроцентрифужные вместимостью 1,5 см3;

- виалы (флаконы) стеклянные вместимостью 2 см3 с навинчиваемыми крышками и тефлоновыми прокладками диаметром 9 мм;

- фильтры нейлоновые мембранные с размером диаметра пор не более

0,45 мкм;

- колбы 2–10(1000)–2 по ГОСТ 1770;

- цилиндры 1–1000–2 по ГОСТ 1770;

- бутыли стеклянные с горловиной под крышку с винтовой резьбой вместимостью 1000 см3 по ГОСТ 34037.

5.2 При определении остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы применяют следующие реактивы:

- ацетонитрил для ВЭЖХ, х. ч.;

- гексан, х.ч.;

- кислоту лимонную, по ГОСТ 3652, х.ч.;

- кислоту муравьиную по ГОСТ 5848, ч. д. а.;

- кислоту ортофосфорную по ГОСТ 6552, х.ч.;

- метанол-яд по ГОСТ 6995, х. ч.

- натрий фосфорнокислый двузамещенный дигидрат по ГОСТ 4172, х.ч.;

- соль динатриевую этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилон Б) по ГОСТ 10652, х.ч.;

- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды;

5.3 При определении остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в качестве образцов сравнения применяют следующие соединения с массовой долей основного вещества не менее 90%:

5.3.1 Стандартные образцы

- демеклоциклин, CAS 127-33-3;

- доксициклин, CAS 564-25-0;

- метациклин, CAS 914-00-1;

- миноциклин, CAS 10118-90-8;

- окситетрациклин, CAS 79-57-2;

- тетрациклин, CAS 60-54-8;

- хлортетрациклин, CAS 57-62-5;

- тигециклин, CAS 220620-09-7.

5.3.2 Изотопно-меченые вещества, применяемые в качестве внутренних стандартов:

- тетрациклин-С13,-N15.

5.4 Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, материалов, посуды и реактивов, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также вспомогательного оборудования, реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

**6 Подготовка к проведению измерений**

**6.1 Приготовление растворов**

**6.1.1 Приготовление подвижных фаз А и Б**

6.1.1.1 Для приготовления подвижной фазы А в стеклянную бутыль вносят 995 см3 деионизированной воды и 5 см3 муравьиной кислоты, перемешивают и дегазируют на ультразвуковой бане в течение 5 мин.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С – не более 1 мес.

6.1.1.2 В качестве подвижной фазы Б используют ацетонитрил.

**6.1.2 Приготовление раствора лимонной кислоты с молярной концентрацией 0,1 моль/дм3**

В мерную колбу вместимостью 1000 см3 вносят 21 г лимонной кислоты и доводят объем до метки деионизированной водой, перемешивают.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С – не более 1 мес.

**6.1.3 Приготовление раствора гидрофосфата натрия с молярной концентрацией 0,2 моль/дм3**

В мерную колбу вместимостью 1000 см3 вносят 35,6 г двузамещенного фосфорнокислого дигидрата натрия и и доводят объем до метки деионизированной водой, перемешивают.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С – не более 1 мес.

**6.1.4 Приготовление буферного раствора для экстракции**

В мерную колбу вместимостью 1000 см3 вносят 600 см3 раствора лимонной кислоты с молярной концентрацией 0,1 моль/дм3 (6.1.2), 400 см3 раствора гидрофосфата натрия с молярной концентрацией 0,2 моль/дм3 (6.1.3). Затем вносят 18,6 г трилона Б, перемешивают. рН раствора доводят ортофосфорной кислотой до значений 4,0 ед.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С – не более 1 мес.

**6.1.5 Приготовление раствора для элюирования**

В стеклянную бутыль вместимостью 1000 см3 вносят 995 см3 метанола и 5 см3 муравьиной кислоты, перемешивают.

Срок хранения при температуре от 15 °С до 25 °С – не более 1 мес.

**6.2 Приготовление рабочих растворов**

**6.2.1 Приготовление исходных растворов *C*0 стандартов антибиотиков тетрациклиновой группы с массовыми концентрациями 1000 мкг/см3**

Для приготовления исходных растворов *С*0 стандартов антибиотиков тетрациклиновой группы в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15 см3 вносят по 4,0–6,0 мг[[2]](#footnote-2)\* каждого стандартного образца и добавляют метанол, массу которого, *mр* (г), вычисляют по формуле

, (1)

где *m* – масса стандартного образца, г;

*M*a– молярная масса чистого вещества, г/моль;

*P*a– степень чистоты стандартного образца, %;

*ρ* – плотность метанола, г/см3;

*M*c–молярная масса соли стандартного образца, г/моль;

*c* – концентрация раствора *С*0, г/см3.

Плотность метанола определяют в соответствии с таблицей 1, учитывая температуру окружающего воздуха в помещении.

Т а б л и ц а 1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Температура  окружающего  воздуха в  помещении, °С | Плотность  метанола, г/см3 | Температура  окружающего  воздуха в  помещении, °С | Плотность  метанола, г/см3 |
| 15,0 | 0,7961 | 20,5 | 0,7909 |
| 15,5 | 0,7956 | 21,0 | 0,7905 |
| 16,0 | 0,7952 | 21,5 | 0,7900 |
| 16,5 | 0,7947 | 22,0 | 0,7895 |
| 17,0 | 0,7942 | 22,5 | 0,7891 |
| 17,5 | 0,7938 | 23,0 | 0,7886 |
| 18,0 | 0,7933 | 23,5 | 0,7881 |
| 18,5 | 0,7928 | 24,0 | 0,7877 |
| 19,0 | 0,7924 | 24,5 | 0,7872 |
| 19,5 | 0,7919 | 25,0 | 0,7867 |
| 20,0 | 0,7914 |  |  |

Рекомендуется проводить данную процедуру при температуре (20 + 5) °С.

Срок хранения растворов *С*0 при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 1 года.

Перед применением растворы *С*0 выдерживают при температуре от 15 °С

до 25 °С не менее 10 мин в воздушной среде, при необходимости используют перемешивание в ультразвуковой бане.

**6.2.2 Приготовление рабочих растворов антибиотиков тетрациклиновой группы *С*1*–С*4**

Рабочие растворы *С*1–*С*4 готовят в мерных колбах вместимостью 10 см3 в соответствии с рисунком 1.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Отбирают по 0,1 см3 каждого раствора *С*0  по 6.2.1 |  | Отбирают  1,0 см3 раствора *С*1 |  | Отбирают  1,0 см3 раствора *С*2 | |  | Отбирают  1,0 см3 раствора *С*3 |
|  |  |  | |  |
| Доводят объем раствора до 10 см3 по метке метанолом, перемешивают | | | | | | | |
|  |  |  |  | |  |  |  |
| Рабочий раствор *С*1 с массовой концентрацией каждого аналита  10 мкг/см3 | Рабочий раствор *С*2  с массовой концентрацией каждого аналита 1 мкг/см3 | Рабочий раствор *С*3  с массовой концентрацией каждого аналита 0,1 мкг/см3 | Рабочий раствор *С*4  с массовой концентрацией каждого аналита 0,01 мкг/см3 |

Рисунок 1–Приготовление рабочих растворов *С*1–*С*4

Растворы *С*1–*С*4 хранят в полипропиленовых пробирках вместимостью 15 см3 при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 3 мес.

Перед применением растворы *С*1–*С*4 выдерживают при температуре от 15°С до 25 °С не менее 10 мин в воздушной среде, при необходимости используют перемешивание в ультразвуковой бане.

**6.2.3 Приготовление исходного раствора *D*0 внутреннего стандарта антибиотиков тетрациклиновой группы с массовой концентрацией 1000 мкг/см3**

Для приготовления исходного раствора *D*0 внутреннего стандарта в отдельную полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см3 вносят 4,0–6,0 мг[[3]](#footnote-3)\* стандартного образца и весовым методом добавляют растворитель метанол, массу которого вычисляют по формуле (1).

Срок хранения раствора *D*0 при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 1 года.

**6.2.4 Приготовление рабочего раствора *D*1 внутреннего стандарта антибиотиков тетрациклиновой группы с массовой концентрацией 10 мкг/см3**

Для приготовления рабочего раствора*D*1 в мерную колбу вместимостью 10 см3 переносят 0,1 см3 раствора *D*0, доводят объем раствора до метки метанолом и перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 3 мес.

**6.2.5 Приготовление рабочего раствора *D*2 внутреннего стандарта антибиотиков тетрациклиновой группы с массовой концентрацией 1 мкг/см3**

Для приготовления рабочего раствора*D*2 в мерную колбу вместимостью 10 см3 переносят 1 см3 раствора *D*1, доводят объем раствора до метки метанолом и перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре от минус 20 °С до минус 40 °С – не более 3 мес.

Перед применением растворы *D*0, *D*1, *D*2 выдерживают при температуре от 15°С до 25 °С не менее 10 мин в воздушной среде, при необходимости используют перемешивание в ультразвуковой бане.

**6.3 Приготовление матричных градуировочных растворов**

**6.3.1 Приготовление матричных градуировочных растворов *G*1 – *G*7**

Матричные градуировочные растворы *G*1–*G*7 готовят в полипропиленовых пробиркахвместимостью 15 см3 из «чистых» проб массой 1,0 г, в которые вносят рабочие стандартные растворы определяемых аналитов *С*1 – *С*4 и рабочий раствор внутреннего стандарта *D*2 в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 – Приготовление матричных градуировочных растворов *G*1–*G*7

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Обозначение и  массовая доля  градуировочного  раствора | Вносимый объем рабочего раствора внутреннего стандарта *D*2, см3 | Вносимый объем рабочего раствора,  см3 | | | |
| *С*1 | *С*2 | *С*3 | *С*4 |
| *G*7 (1000нг/ см3) | 0,05 | 0,1 | – | – | – |
| *G*6 (500нг/ см3) | 0,05 | 0,05 | – | – | – |
| *G*5 (250нг/ см3) | 0,05 | – | 0,25 | – | – |
| *G*4 (100нг/ см3) | 0,05 | – | 0,1 | – | – |
| *G*3(50нг/ см3) | 0,05 | – | 0,05 | – | – |
| *G*2 (10нг/ см3) | 0,05 | – | – | 0,1 | – |
| *G*1(1нг/ см3) | 0,05 | – | – | – | 0,1 |

Пробирки встряхивают в шейкере в течение 1 мин, осторожно приливают 10 см3 буферногораствора для экстракции (см. 6.1.4) и проводят дальнейшую обработку растворов согласно 7.2.1.2 (без повторного добавления раствора внутреннего стандарта *D*2).

Срок хранения растворов *G*1–*G*7 при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 24 ч.

**6.4 Установление градуировочной характеристики**

6.4.1 Установление и расчет градуировочной характеристики проводят в каждой серии анализов с помощью программного обеспечения хромато-масс-спектрометрической системы.

6.4.2 Проводят измерения не менее четырех матричных градуировочных растворов, приготовленных по 6.3, в порядке возрастания их концентраций. Определяют времена удерживания ион-продуктов аналитов и их внутреннего стандарта.

6.4.3 Вычисление площади пика проводят для каждого ион-продукта анализируемых аналитов и их внутреннего стандарта. Количественное определение аналитов проводят по одному, наиболее интенсивному, ион-продукту.

6.4.4 Градуировочную характеристику устанавливают в координатах «отношение площади пика определяемого аналита к площади пика внутреннего стандарта этого аналита» – «массовая концентрация определяемого аналита в градуировочном растворе к массовой концентрации внутреннего стандарта этого аналита». Концентрация внутреннего стандарта в градуировочном растворе 50 нг/см3.

При построении градуировочной характеристики используют линейную функцию вида *y* = *a + bx*, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99.

6.4.5 При установлении градуировочной характеристики в качестве внутреннего стандарта используют изотопно-меченый тетрациклин – тетрациклин-С13,-N15[[4]](#footnote-4).

**7 Отбор и подготовка проб**

**7.1 Отбор проб**

7.1.1 Отбор проб мяса, мясных продуктов, субпродуктов – по ГОСТ 7269, ГОСТ 32951.

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

7.1.3 Отбор проб рыбы, креветок – по ГОСТ 31339.

7.1.4 Отбор проб колбасных изделий и продуктов из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц – по ГОСТ 9792, мясных полуфабрикатов – по ГОСТ 32951, кулинарных изделий и полуфабрикатов из рубленого мяса – по ГОСТ 4288.

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

7.1.6 Отбор проб молока (включая сухое и концентрированное молоко) и молочных продуктов – по ГОСТ 26809.1.

7.1.7 Отбор проб меда – по ГОСТ 19792.

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

7.1.9 Пробы, отобранные по 7.1.1–7.1.3, при отсутствии возможности испытаний в день отбора, замораживают ихранят при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С. Размораживание проводят выдерживанием емкостей с пробой в холодильнике или при комнатной температуре до состояния, позволяющего проводить их дальнейшую обработку. Выделившуюся при размораживании жидкость используют при подготовке пробы.

**7.2 Подготовка проб**

**7.2.1 Подготовка проб мяса, мясных продуктов, мяса и продуктов из мяса птицы, субпродуктов, рыбы, креветок, молока и молочных продуктов, меда**

7.2.1.1 Мышечную ткань предварительно очищают от грубой соединительной ткани. Мясо, субпродукты, мясные продукты гомогенизируют.

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

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

Подготовку проб рыбы проводят по ГОСТ 7636–85 (раздел 2), креветок – по ГОСТ 7636–85 (пункт 2.9).

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).

Подготовка проб меда – по ГОСТ 19792–2017 (подраздел 7.2).

7.2.1.2Из пробы, подготовленной в соответствии с 7.2.1.1, отбирают навеску (1,00 + 0,05) г в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см3, пипеточным дозатором вносят 0,05 см3 раствора внутреннего стандарта *D*2 (см. 6.2.5), осторожно приливают 10,0 см3 буферного раствора для экстракции (см. 6.1.4). Пробирку помещают на 10 мин в шейкер для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С[[5]](#footnote-5). Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ) по п.7.2.2.

**7.2.2 Очистка подготовленных проб методом ТФЭ**

7.2.2.1 Активируют и уравновешивают картридж для твердофазной экстракции с сорбентом на основе сополимера дивинилбензола и винилпирролидона пропуская последовательно 6,0 см3 метанола, 6,0 см3 деионизированной воды. Наносят на картридж экстракт (см. 7.2.1.2). Затем пропускают через картридж 6,0 см3 деионизированной воды. Промывную фракцию отбрасывают. Картридж сушат под вакуумом в течение 5 мин. Элюирование проводят в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см3, пропуская через картридж 6,0 см3 раствора для элюирования (см. 6.1.5). Элюат помещают в систему отдувки растворителей и концентрируют при температуре 40°С до 0,5 см3. В полученный концентрат вносят 0,5 см3 подвижной фазы А (см. 6.1.1.1), затем переносят в микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см3 и доводят объем подвижной фазой А до 1,0 см3. Центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Раствор фильтруют через мембранный фильтр в виалу и используют для ВЭЖХ-МС/МС измерения.

**7.2.3 Подготовка проб яиц и яичных продуктов**

7.2.3.1 Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе до однородной массы. Подготовка проб яичных продуктов по ГОСТ 31720-2012

(пункт 4.3).

7.2.3.2 Из пробы, подготовленной в соответствии с 7.2.3.1, отбирают навеску (1,00 + 0,05) г в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см3, пипеточным дозатором вносят 0,05 см3 раствора внутреннего стандарта *D*2 (см. 6.2.5), осторожно приливают 10,0 см3 буферного раствора для экстракции (см. 6.1.4), и помещают в шейкер на 10 мин для экстракции. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Полученный экстракт переливают в чистую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см3 и проводят удаление жировых фракций, осторожно приливая 4,0 см3 гексана, и помещают в шейкер на 10 мин для перемешивания. Затем центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °С. Верхний гексановый слой отбрасывают. Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ) и проводят дальнейшую подготовку по п.7.2.2.

**8 Порядок выполнения анализа**

**8.1 Условия хроматографического разделения**

8.1.1 Хромато-масс-спектрометр включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры рабочих режимов масс-спектрометрического детектирования и хроматографического разделения.

8.1.2 Например, для колонки длиной 150 мм заполненной обращенно-фазовым сорбентом *С*18 с размером частиц не более 5,0 мкм соблюдают следующие условия хроматографического анализа:

- температура термостата колонки – 40 ºС;

- скорость потока подвижной фазы – 0,2 см3/мин;

- объем вводимой пробы – 10 мм3.

8.1.3 Разделение проводят в режиме градиентного элюирования (приготовление подвижных фаз А и Б по 6.1.1) в соответствии с таблицей 3.

Т а б л и ц а 3 – Условия хроматографического разделения

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | Подвижная фаза А, % | Подвижная фаза Б,% |
| 0,0 | 95 | 5 |
| 8,0 | 30 | 70 |
| 8,1 | 95 | 5 |
| 12,0 | 95 | 5 |

8.1.4 Общие параметры настройки масс-спектрометрического детектора:

- температура источника (ТЕМ) – 450 оС;

- напряжение ионизации электрораспылением (IS) – 4500 В;

- разрешение квадруполей *Q1/Q3* – единичное;

- значение вспомогательного газа (CUR) – 25;

- значение газа источника ионов 1 (GS1) – 45;

- значение газа источника ионов 2 (GS2) – 45;

- значение газа ячейки соударений (*CAD*) – 7.

8.1.5 Параметры работы масс-спектрометрического детектора в режиме MRM в условиях электрораспыления с регистрацией положительных ионов для анализируемых аналитов и внутреннего стандарта, приведены в таблице 4.

Т а б л и ц а 4

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование соединения | Ион предшественник, m/z | Дочерние ионы, m/z | Потенциал декластеризации, В | Энергия соударений, эВ/  Потенциал на выходе из ячейки соударений, В |
| Тетрациклин | 445,2 | 410,2 | 90 | 25/11 |
| 427,2 | 90 | 18/11 |
| Окситетрациклин | 461,2 | 444,2 | 90 | 21/12 |
| 426,1 | 90 | 26/11 |
| Хлортетрациклин | 479,1 | 462,1 | 90 | 22/11 |
| 444,2 | 90 | 28/12 |
| Доксициклин | 445,2 | 428,2 | 90 | 23/11 |
| 410,2 | 90 | 32/11 |
| Демеклоциклин | 465,1 | 448,1 | 90 | 22/12 |
| 430,1 | 90 | 30/11 |
| Миноциклин | 458,3 | 441,2 | 40 | 22/13 |
| 337,0 | 40 | 50/13 |
| Метациклин | 443,2 | 426,0 | 40 | 21/13 |
| 201,0 | 25 | 44/13 |
| Тигециклин | 586,0 | 513,0 | 162 | 35/13 |
| 569,0 | 160 | 28/13 |
| Тетрациклин-С13,-N15 | 469,3 | 433,2 | 90 | 25/11 |

Примечание – Приведенные выше параметры хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования могут отличаться в зависимости от используемого оборудования.

**8.2 ВЭЖХ-МС/МС измерение**

8.2.1 Для определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы проводят ВЭЖХ-МС/МС измерение в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования в условиях хроматографических измерений с параметрами указанными в 8.1.

8.2.2 Анализ выполняют в виде серии измерений, включающей следующие образцы:

- подвижную фазу А (см. 6.1.1.1);

- «чистую пробу»;

- градуировочные растворы (см. 6.3);

- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

**9 Обработка результатов измерений**

9.1 В соответствии с данными, полученными при измерении градуировочных растворов, проводят количественную обработку хроматограмм с использованием программного обеспечения. Метод обработки хроматограмм – внутренний стандарт.

9.2 Расчеты остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы и площади пика выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

9.3 За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений анализируемой пробы, если выполняется условие приемлемости

 (2)

где *Х*1и *Х*2 *–* результаты параллельных определений содержания аналитов,

мкг/кг;

*r* – значение предела повторяемости, %, указанное в таблицах 5 и 6.

9.4 Если условие 3 не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данным методом измерений. За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие

|  |  |
| --- | --- |
| , | ((3) |

где *Х*max, *Х*min – максимальное и минимальное значения из полученных

четырех результатов параллельных определений содержания

аналита, мкг/кг;

*СR*0,95 – значение критического диапазона для уровня вероятности

Р = 0,95, вычисляемое по формуле для *n* – результатов

определений

, (4)

для n = 4

|  |  |
| --- | --- |
| , | (5) |

где σ*r* – показатель повторяемости, % (в соответствии с таблицами 5 и 6).

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

9.6 Если результат превышает верхний предел измерения, то выдают результат в следующей формулировке: «Содержание аналита превышает верхний предел диапазона измерения методики».

**10 Метрологические характеристики**

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с относительной расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений, указанной в таблицах 5 и 6 при коэффициенте охвата *k* = 2 и доверительной вероятности *Р* = 0,95.

Т а б л и ц а 5 Показатели точности метода при проведении измерений содержания антибиотиков тетрациклиновой группы для мяса и мясных продуктов, мяса птицы и продуктов из мяса птицы, молока и молочных продуктов, рыбы, креветок

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Аналит | Диапазон измерений содержания аналитов,  мкг/кг | Значение относитель  ной расширенной неопределен-ности *Ui*,% | Показатель повторяемос  ти (относитель  ное стандартное отклонение повторяемос  ти) σr, % | Показатель воспроизводи-мости (относительное стандартное отклонение воспроизводи-мости) *σ*R,% | Предел повто  ряемости  r, % |
| Тетрациклин | От 1 до 100 включ. | 26 | 11 | 13 | 31 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 14 | 6 | 7 | 15 |
| Окситетрациклин | От 1 до 250 включ. | 28 | 11 | 13 | 31 |
| Св.250 до 1000 включ. | 16 | 7 | 8 | 20 |
| Хлортетрациклин | От 1 до 250 включ. | 29 | 13 | 14 | 36 |
| Св.250 до 1000 включ. | 18 | 8 | 9 | 23 |
| Доксициклин | От 1 до 100 включ. | 25 | 11 | 12 | 31 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 20 | 8 | 10 | 23 |
| Демеклоциклин | От 1 до 100 включ. | 28 | 12 | 14 | 34 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 25 | 10 | 12 | 28 |
| Миноциклин | От 1 до 250 включ. | 28 | 13 | 14 | 36 |
| Св.250 до 1000 включ. | 17 | 6 | 8 | 17 |
| Метациклин | От 1 до 250 включ. | 26 | 12 | 13 | 34 |
| Св.250 до 1000 включ. | 15 | 6 | 7 | 17 |
| Тигециклин | От 10 до 100 включ. | 24 | 8 | 12 | 23 |
| Св.100 до 1000 включ. | 17 | 7 | 8 | 20 |

Т а б л и ц а 6 – Показатели точности метода при проведении измерений содержания антибиотиков тетрациклиновой группы для субпродуктов, яиц, яичных продуктов, меда

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Аналит | Диапазон измерений содержания аналитов,  мкг/кг | Значение относитель  ной расширенной неопределен-ности *Ui*,% | Показатель повторяемос  ти (относитель  ное стандартное отклонение повторяемос  ти) σr, % | Показатель воспроизводи-мости (относительное стандартное отклонение воспроизводи-мости) *σ*R,% | Предел повто  ряемости  r, % |
| Тетрациклин | От 1 до 100 включ. | 29 | 12 | 14 | 34 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 19 | 6 | 9 | 15 |
| Окситетрациклин | От 1 до 100 включ. | 30 | 6 | 15 | 17 |
| Св.100 до 1000 включ. | 18 | 6 | 8 | 17 |
| Хлортетрациклин | От 1 до 250 включ. | 26 | 10 | 13 | 28 |
| Св.250 до 1000 включ. | 18 | 6 | 9 | 17 |
| Доксициклин | От 1 до 100 включ. | 26 | 8 | 13 | 23 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 10 | 8 | 10 | 23 |
| Демеклоциклин | От 1 до 100 включ. | 28 | 13 | 14 | 36 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 21 | 8 | 10 | 23 |
| Миноциклин | От 1 до 100 включ. | 24 | 6 | 12 | 17 |
| Св.100 до 1000 включ. | 18 | 6 | 9 | 17 |
| Метациклин | От 1 до 100 включ. | 28 | 12 | 14 | 34 |
| Св.100 до 1000 включ. | 18 | 8 | 9 | 23 |
| Тигециклин | От 10 до 100 включ. | 27 | 7 | 12 | 20 |
| Св.100 до 1000 включ. | 16 | 5 | 7 | 14 |

## 11 Оформление результатов измерений

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

 при *Р*=0,95 (6)

где  – среднее арифметическое значение результатов n параллельных

измерений содержания *i*-го аналита в анализируемой пробе, мкг/кг;

*Ui* – значение относительной расширенной неопределенности содержания

*i*-го аналита для соответствующего диапазона измерений, %

(см. таблицы 5 и 6).

## 12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности

12.1 Расхождение между результатами измерений, полученными в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности, не должно превышать предела внутрилабораторной прецизионности:

, (7)

где  и  – результаты измерений содержания аналита в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности – средние арифметические двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, для которых выполняются условия (2) и (3);

– предел в внутрилабораторной прецизионности, выраженный в относительных единицах.

Относительные значения предела внутрилабораторной прецизионности приведены в таблицах 7 и 8.

12.2 При выполнении условия (7) приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднеарифметическое значение.

Т а б л и ц а 7 – Относительные значения пределов внутрилабораторной прецизионности при доверительной вероятности Р=0,95 для мяса и мясных продуктов, мяса птицы и продуктов из мяса птицы, молока и молочных продуктов, рыбы, креветок

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Аналит | Диапазон измерения, мкг/кг | Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности Р=0,95 расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), *RЛ*, % |
| Тетрациклин | От 1 до 100 включ. | 31 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 17 |
| Окситетрациклин | От 1 до 250 включ. | 31 |
| Св. 250 до 1000 включ. | 19 |
| Хлортетрациклин | От 1 до 250 включ. | 33 |
| Св. 250 до 1000 включ. | 21 |
| Доксициклин | От 1 до 100 включ. | 28 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 24 |
| Демеклоциклин | От 1 до 100 включ. | 33 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 28 |
| Миноциклин | От 1 до 250 включ. | 33 |
| Св. 250 до 1000 включ. | 19 |
| Метациклин | От 1 до 250 включ. | 31 |
| Св. 250 до 1000 включ. | 16 |
| Тигециклин | От 10 до 100 включ. | 28 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 19 |

Т а б л и ц а 8 – Относительные значения пределов внутрилабораторной прецизионности при доверительной вероятности Р=0,95 для субпродуктов, яиц, яичных продуктов, меда

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Аналит | Диапазон измерения, мкг/кг | Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности Р=0,95 расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), *RЛ*, % |
| Тетрациклин | От 1 до 100 включ. | 33 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 21 |
| Окситетрациклин | От 1 до 100 включ. | 35 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 19 |
| Хлортетрациклин | От 1 до 250 включ. | 31 |
| Св. 250 до 1000 включ. | 21 |
| Доксициклин | От 1 до 100 включ. | 31 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 24 |
| Демеклоциклин | От 1 до 100 включ. | 33 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 24 |
| Миноциклин | От 1 до 100 включ. | 28 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 21 |
| Метациклин | От 1 до 100 включ. | 33 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 21 |
| Тигециклин | От 10 до 100 включ. | 28 |
| Св. 100 до 1000 включ. | 16 |

## 13 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Контроль качества результатов измерений в пределах лаборатории рекомендуется осуществлять по ГОСТ ИСО 5725-6 используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-6-2003 (пункт 6.2.2) и показателя правильности по ГОСТ Р ИСО 5725-6-2003 (пункт 6.2.4).

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.

УДК 637.07:638.162:006.354 МКС 67.100.10

67.120.10

67.120.20

67.120.30

67.180.10

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, антибиотики тетрациклиновой группы, определение содержания, ВЭЖХ-МС/МС измерение

|  |  |
| --- | --- |
| Руководитель организации-разработчика:  Зам. директора ФГБУ «ВГНКИ»  Исполнители:  Научный сотрудник отдела безопасности  пищевой и кормовой продукции  Гл. специалист сектора технического регулирования и стандартизации | А.В. Третьяков    Д.Ю. Некрасов      А.В. Полетаева |

1. \*Срок хранения «чистых проб» при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С – не более 3 мес. [↑](#footnote-ref-1)
2. \* Допускается взятие навески стандартного образца, отличающейся от указанного диапазона в зависимости от фасовки и физико-химических свойств вещества.  [↑](#footnote-ref-2)
3. \* Допускается взятие навески внутреннего стандарта, отличающейся от указанного диапазона в зависимости от фасовки и физико-химических свойств вещества. [↑](#footnote-ref-3)
4. Допускается в качестве внутреннего стандарта использовать иные изотопно-меченые тетрациклины (тетрациклин-Д6, окситетрациклин-С13,-N15, тигециклин-Д9 и др.). [↑](#footnote-ref-4)
5. [↑](#footnote-ref-5)