МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора БелГИМ

_____ А.Л. Коломиец
«15» _____ 2015 г

УТВЕРЖДАЮ

Директор государственного предприятия «НПЦГ»

_____ С.И. Сычик
«22» 04 2015 г.

МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕНИЦИЛЛИНОВ В СЫРЬЕ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

МВИ.МН 5200-2015

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 8831/2015
об аттестации МВИ от 25.09 **20** 15 **г.**

Минск 2015

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1	Область применения	3
2	Точность измерений	3
3	Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы	3
4	Метод измерения	6
5	Требования безопасности	7
6	Требования к квалификации оператора	7
7	Условия выполнения измерений	7
8	Подготовка к выполнению измерений	8
9	Выполнение измерений	15
10	Обработка результатов измерений	16
11	Оформление результатов испытаний	17
12	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	17
13	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	18
14	Проверка стабильности результатов измерений	18
	Приложение А. Нормативные ссылки	21
	Приложение Б. Показатели прецизионности методики	22
	Приложение В. Пример расчета неопределенности измерений	24
	Приложение Г. Примеры хроматограмм	35

Федеральный государственный институт
Отдел научно-технической информации и нормативных документации

1 Область применения

Методика предназначена для идентификации и количественного определения остаточных количеств антибиотиков пенициллиновой группы (амоксициллина, ампициллина, пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина, диклоксациллина) в сырье животного происхождения и пищевых продуктах.

Метод основан на выделении пенициллинов из пищевой матрицы при помощи ацетонитрильно-водной смеси, отгонке растворителя, растворении остатка в фосфатном буферном растворе с pH 6,5, обезжиривании раствора с помощью гексана, очистке экстракта, концентрировании аналитов при помощи твердофазной экстракции и количественном анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Диапазон определяемых концентраций для каждого пенициллина:

для молока и молочных продуктов - 2,0– 100,0 мкг/кг;

для мяса и мясных продуктов – 10,0 – 800,0 мкг/кг.

Нижний предел измерения методики (LOQ) составляет:

для молока и молочных продуктов - 2,0 мкг/кг;

для мяса и мясных продуктов – 10,0 мкг/кг.

2 Точность измерений

Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей прецизионности (повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности) и максимальной относительной расширенной неопределенности при доверительной вероятности P=0,95 были получены в соответствии с ТНПА [1-6] (приложение А) и представлены в таблицах 1 - 2.

Таблица 1 – Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95 для молока и молочных продуктов

Наименование антибиотика	$K_{гр}$ %		Показатель повторяемости s_r,%	Показатель промежуточной прецизионности $s_{I(TO)}$,%	Предел повторяемости r,%	Пределпромежуточной прецизионности $r_{(TO)}$,%	Расширенная неопределенность измерения, U, %
	2 – 20 мкг/кг	10 - 100 мкг/кг					
Амоксициллин	14	13	8	8	21	23	34
Ампициллин	14	13	7	9	19	24	32
Пенициллин G	12	8	7	8	18	21	31
Пенициллин V	11	9	6	8	16	22	29
Оксациллин	11	9	6	8	17	22	29
Клоксациллин	10	10	7	9	21	24	30
Нафциллин	11	11	7	9	18	24	29
Диклоксациллин	12	11	7	8	18	23	29

Таблица 2 – Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95 для мяса и мясных продуктов

Наименование антибиотика	$K_{гр}$ %		Показатель повторяемости s_r,%	Показатель промежуточной прецизионности $s_{I(TO)}$,%	Предел повторяемо-сти r,%	Пределпромежуточной прецизионности $r_{I(TO)}$,%	Расширенная неопределенность измерения, U, %
	2 – 20 мкг/кг	10 - 100 мкг/кг					
Амоксициллин	15	21	5	8	14	21	31
Ампициллин	13	18	6	8	18	22	29
Пенициллин G	11	11	5	6	14	15	27
Пенициллин V	10	13	4	5	12	15	26
Оксациллин	11	14	5	7	13	19	26
Клоксациллин	11	14	4	7	12	21	27
Нафциллин	11	16	6	7	15	19	26
Диклоксациллин	10	13	5	7	14	18	25

Для всех проб во всем диапазоне измерений смещение незначимо.

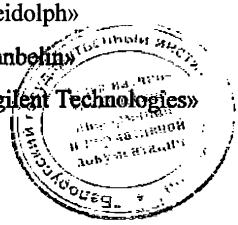
3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Жидкостный хроматограф Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6410		Фирма «Agilent Technologies»
Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г		ГОСТ 24104
Дозаторы пипеточные 1-канальные с варьируемым объемом дозирования	Диапазон измерений: (1-5) $см^3$ (0,1-1,0) $см^3$ (0,01- 0,10) $см^3$	фирма «Thermo Scientific»

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Колонка хроматографическая Zorbax SB-C18 размером 2,1 мм × 150 мм, зернение 3,5 мкм	фирма «Agilent Technologies»
Предколонка Zorbax SB-C18 5 мкм, (2,0 мм х 12,5 мм)	фирма «Agilent Technologies»
Пробирки полипропиленовые вместимостью 15 и 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками	фирма «Oxygen Scientific»
Центрифуга лабораторная охлаждаемая 3-18К	фирма «Sigma»
Электровстряхиватель вортексного типа Multi Reax	фирма «Heidolph»
Электровстряхиватель вортексного типа Reax Control	фирма «Heidolph»
Ультразвуковая баня Sonorex super RK 103H	фирма «Banbelin»
Вакуумное устройство для твердофазной экстракции	фирма «Agilent Technologies»



Мембранный вакуумный насос N 022 AT.18		фирма «KNF Neuberger»
Картриджи для твердофазной экстракции «Chromabond HR-X», 3см^3, 200 мг		фирма «Macherey-Nagel», кат. № 730931
Система очистки воды Easy pure II RF/UV; D7035		фирма «Thermo Scientific»
Испаритель аналитический Zipvap 20		фирма «Glas-Col»
Виалы для автосамплера вместимостью 2 см^3 с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками		фирма «Agilent Technologies»
Измельчитель		фирма «Tefal»
Шприцевой мембранный фильтр Chromafil RC-20/15 MS с размером пор 0,2 мкм диаметром 15 мм		фирма «Macherey-Nagel»
Шприц инъекционный однократного применения 2А		фирма «МедПласт»
Кондиционер		фирма «Mitsubishi»
Компьютер HP xw 4600 Workstation с установленным программным обеспечением Mass Hunter		фирма «Hewlett-Packard»
Установка компрессорная СБ4-16.GMS150K		ООО «Ремеза БелТС»
Холодильник с морозильной камерой		ООО «Атлант»
Система для фильтрования и дегазации элюента		фирма «Agilent Technologies»
Мембранные фильтры из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,2 мкм диаметром 13 мм		фирма «Agilent Technologies»
Колба плоскодонная	Кн-2-250-29/32 ТС	ГОСТ 25336
Стакан химический	В-1-250 ТС	ГОСТ 25336
	В-1-500 ТС	ГОСТ 25336
Колбы мерные	2-10-2	ГОСТ 1770
	2-50-2	ГОСТ 1770
	2-100-2	ГОСТ 1770
	2-500-2	ГОСТ 1770
	2-1000-2	ГОСТ 1770
Цилиндр мерный	*2-100-1*	*ГОСТ 1770*

3.3 Реактивы и материалы

Ампициллина тригидрат, содержание основного вещества ≥99,7%	фирма «Fluka Analytical», кат. №31591
Амоксициллина тригидрат, содержание основного вещества≥ 98,7 %	фирма «Sigma-Aldrich», кат. № 31586
Пенициллина V калиевая соль, содержание основного вещества ≥98,9 %	фирма «Sigma-

	Aldrich»; кат. № 46616
Пенициллина G калиевая соль, содержание основного вещества ≥99,6 %	фирма «Sigma-Aldrich»; кат. № 46609
Пенициллина G-d7 N-этилпиперидиновая соль, содержание основного вещества ≥98 %	фирма «Sigma-Aldrich»; кат. № 32985
Оксациллина натриевой соли гидрат, содержание основного вещества ≥99,2 %	фирма «Sigma-Aldrich»; кат. № 46589
Клоксациллина натревой соли моногидрат, содержание основного вещества≥ 98,5 %	фирма «Sigma-Aldrich»; кат. № 46140
Диклоксациллина натревой соли гидрат, содержание основного вещества ≥99,0 %	фирма «Sigma-Aldrich»; кат. № 46182
Нафциллина натриевая соль, содержание основного вещества 99,4 %	фирма «Sigma»; кат. № 32071
Ацетонитрил для ВЭЖХ, ≥ 99,9 %	фирма «Sigma-Aldrich», кат. № 34851
Метанол для ВЭЖХ, ≥ 99,9 %	фирма «Sigma-Aldrich»; кат. № 34860
н-Гексан для ВЭЖХ, ≥ 99,9 %	фирма «Panreac»; кат. № 361347.1612
Муравьиная кислота, ≥ 99,9 %	фирма «Acros organics»; кат. № 147930010
Натрий фосфорнокислый 2- замещенный, 2-х водный	фирма «Applichem»; кат. № A3567,0500
Натрий фосфорнокислый 1-замещенный, 2-х водный, ч.д.а.	ГОСТ 245
Натрия гидроокись, ч.д.а.	ГОСТ 4328
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства по точности, не уступающие рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты.

4 Метод измерения

Метод основан на выделении пенициллинов из пищевой матрицы при помощи ацетонитрильно-водной смеси, отгонке растворителя, растворении остатка в фосфатном буферном растворе с pH 6,5, обезжиривании раствора с помощью гексана, очистке экстракта и концентрировании аналита при помощи твердофазной экстракции и количественном анализе

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

5 Требования безопасности

При выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности [5]
- пожарной безопасности [6]
- техники безопасности при работе в химической лаборатории [7]
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

Помещение, в котором проводится определение антибиотиков, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды. Работу с растворителями следует проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты (очки, перчатки).

6 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее образование, изучившие настоящую методику, прошедшие подготовку для работы на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором.

7 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно [8] должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных (20 ± 2) °С;
- температура воздуха при выполнении измерений (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление (630 – 800) мм рт. ст.;
- влажность воздуха не более 70 % при температуре 25 °С;
- напряжение питающей сети (230 ± 10) В;
- частота переменного тока (50 ± 0,4) Гц

Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией, подводкой воды и системой кондиционирования.

Выполнение измерений на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором проводятся в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору и настоящей методикой.

Отдел научно-технической информации и правовой документации

8 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, установление градуировочной характеристики, отбор и подготовка проб к анализу.

8.1 Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для колонки и детектора. Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 40 - 60 мин. Стабилизацию работы детектора после отключения электропитания проводят в течение 1 суток.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление 10 % раствора гидроокиси натрия

В стакан вместимостью 250 $см^3$ взвешивают (10,00 ± 0,01) г гидроокиси натрия, приливают 90 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения соли.

Раствор хранится в закрытой емкости при комнатной температуре в течение 1 месяца.

8.2.2 Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 6,5

В стакан вместимостью 500 $см^3$ взвешивают (6,23 ± 0,01) г гидрофосфата натрия 2-х водного и (10,41 ± 0,01) г дигидрофосфата натрия 2-х водного, приливают 300 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения соли. Измеряют pH полученного раствора. При необходимости регулируют кислотность до pH 6,5 с помощью 10 % раствора гидроокиси натрия. Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ и доводят объем дистиллированной водой до метки.

Раствор хранится в закрытой емкости при комнатной температуре в течение 1 месяца.

8.2.3 Приготовление 0,1 % раствора муравьиной кислоты (по объему)

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ содержащую 600 $см^3$ деионизованной воды помещают 1 $см^3$ муравьиной кислоты, доводят объем колбы до метки деионизованной водой, перемешивают и фильтруют через фильтр миллипоре.

Раствор хранится в закрытой емкости при комнатной температуре в течение 1 месяца.

8.2.4 Приготовление градуировочных растворов

8.2.4.1 Приготовление основных растворов пенициллинов концентрацией 1,0 мг/$см^3$ (растворы А)

Взвешивают навеску каждого пенициллина (ампициллина, амоксициллина, пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, диклоксациллина, нафциллина) (п.3.3.) эквивалентную (0,010 ± 0,0003) г чистого вещества (с учетом молекулярного веса соединения в диссоциированном состоянии) и помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 10 $см^3$. Добавляют 8 $см^3$ деионизованной воды и помещают в ультразвуковую баню на 1 минуту при

t=(20 ± 2) °С, затем доводят объем полученного раствора до метки деионизованной водой и перемешивают.

Растворы хранятся в морозильной камере в полипропиленовых пробирках с завинчивающимися крышками при температуре (-18 ± 2) °С в течение 1 месяца. Растворы стабильны при 6 - 7 циклах замораживания – размораживания.

8.2.4.2 Приготовление основного раствора смеси пенициллинов концентрацией 1,0 мкг/см^3 (раствор Б)

По 0,1 см^3 каждого основного стандартного раствора пенициллина концентрацией 1,0 мг/см^3 (растворы А), приготовленные по 8.2.4.1, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки деионизованной водой и тщательно перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежит.

8.2.4.3 Приготовление рабочего градуировочного раствора смеси пенициллинов концентрацией 100,0 нг/см^3 (раствор В)

5 см^3 основного стандартного раствора смеси пенициллинов концентрацией 1,0 мкг/см^3 (раствор Б), приготовленного по 8.2.4.2, переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, доводят объем до метки деионизованной водой и тщательно перемешивают.

8.2.4.4 Приготовление рабочего градуировочного раствора смеси пенициллинов концентрацией 10,0 нг/см^3 (раствор Г)

1 см^3 основного стандартного раствора смеси пенициллинов концентрацией 1,0 мкг/см^3 (раствор Б), приготовленного по 8.2.4.2, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки деионизованной водой и тщательно перемешивают.

Раствор готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежит.

8.2.4.5 Приготовление основного раствора внутреннего стандарта пенициллина G-d$_7$ концентрацией 100,0 мкг/см^3 (раствор Д)

10 мг внутреннего стандарта пенициллина G-d7 количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³. Добавляют в колбу 80 см³ деионизованной воды, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 1 минуту, доводят объем полученного раствора до метки деионизованной водой и перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в полипропиленовых пробирках вместимостью 15 см^3 с завинчивающимися пробками при температуре (-20 ± 2)°С в течение 1 года. Раствор стабилен при 6 - 7 циклах замораживания – размораживаниях.

8.2.4.6 Приготовление рабочего раствора внутреннего стандарта пенициллина G-d$_7$ концентрацией 1,0 мкг/см^3 (раствор Е)

1 см^3 основного раствора внутреннего стандарта пенициллина G-d7 концентрацией 100,0 мкг/см^3 (раствор Д), приготовленного по 8.2.4.5, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3,

доводят объем до метки деионизованной водой и тщательно перемешивают. Раствор готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежит.

8.2.4.7 Приготовление градуировочных растворов пенициллинов

При анализе методом ВЭЖХ-МС/МС большое влияние на отклик аналита оказывают соединения, присутствующие в пищевой матрице, которые могут, как увеличивать, так и уменьшать его ионизацию. Поэтому, чтобы минимизировать этот эффект и учесть потери аналита в результате пробоподготовки, в ВЭЖХ-МС/МС анализе принято пользоваться матричной калибровкой. Для построения матричной калибровки из основных стандартных растворов смеси пенициллинов готовят серию градуировочных растворов с концентрациями пенициллинов 2,0; 4,0; 10,0; 20,0; 80,0 и 100 нг/см^3 каждого, содержащих 50 нг/см^3 внутреннего стандарта (для молока и молочных продуктов) и 10,0; 20,0; 80,0; 100,0; 400,0; и 800,0 нг/см^3 каждого, содержащих 100 нг/см^3 внутреннего стандарта (для мяса, печени и продуктов на их основе). Для этого в центрифужные пробирки вместимостью 50 см^3 помещают по (1,000 ± 0,005) г соответствующей пищевой матрицы не содержащей пенициллины (бланк) и предварительно подготовленной согласно п. 8.6, последовательно приливают необходимое количество дистиллированной воды, основных градуировочных растворов пенициллинов и дейтерированного пенициллина G-d_7. Схема приготовления градуировочных растворов пенициллинов представлена в таблицах 3 - 5.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов пенициллинов для анализа молока, жидких, твердых и пастообразных молочных продуктов

№ Гр. р-ра	Концентрация каждого пенициллина, нг/см^3	m («чистого образца»), г	V (дист. воды), см^3	V (осн. стандартного р-ра смеси пенициллинов), см^3	V (р-ра внутр. стандарта), см^3	V (ацетонитрила), см^3
0	0 (бланк)	1,00	2,00	0	0,05 (раствор Е)	10,0
1	2,0	1,00	1,80	0,20 (раствор Г)	0,05 (раствор Е)	10,0
2	4,0	1,00	1,60	0,40 (раствор Г)	0,05 (раствор Е)	10,0
3	10,0	1,00	1,00	1,00 (раствор Г)	0,05 (раствор Е)	10,0
4	20,0	1,00	1,80	0,20 (раствор В)	0,05 (раствор Е)	10,0
5	80,0	1,00	1,20	0,80 (раствор В)	0,05 (раствор Е)	10,0
6	100,0	1,00	1,00	1,00 (раствор В)	0,05 (раствор Е)	10,0

Отдел научно-технической информации и метрологии

Таблица 4 – Схема приготовления градуировочных растворов пенициллинов для анализа сухого молока, сухих детских молочных смесей, сухой молочной сыворотки и т.д.

№ Гр. р-ра	Концентрация каждого пенициллина, нг/см^3	m («чистого образца»), г	V (дист. воды), см^3	V (осн. стандартного р-ра смеси пенициллинов), см^3	V (р-ра внутр. стандарта), см^3	V (ацетонитрила), см^3
0	0 (бланк)	1,00	7,00	0	0,05 (раствор Е)	10,0
1	2,0	1,00	6,80	0,20 (раствор Г)	0,05 (раствор Е)	10,0
2	4,0	1,00	6,60	0,40 (раствор Г)	0,05 (раствор Е)	10,0
3	10,0	1,00	6,00	1,00 (раствор Г)	0,05 (раствор Е)	10,0
4	20,0	1,00	6,80	0,20 (раствор В)	0,05 (раствор Е)	10,0
5	80,0	1,00	6,20	0,80 (раствор В)	0,05 (раствор Е)	10,0
6	100,0	1,00	6,00	1,00 (раствор В)	0,05 (раствор Е)	10,0

Таблица 5 – Схема приготовления градуировочных растворов пенициллинов для анализа мяса, субпродуктов и продуктов на их основе

№ Гр. р-ра	Концентрация каждого пенициллина, нг/см^3	m («чистого образца»), г	V (дист. воды), см^3	V (осн. стандартного р-ра смеси пенициллинов), см^3	V (р-ра внутр. стандарта), см^3	V (ацетонитрила), см^3
0	0 (бланк)	1,00	2,00	0	0,10 (раствор Е)	10,0
1	10,0	1,00	1,00	1,00 (раствор Г)	0,10 (раствор Е)	10,0
2	20,0	1,00	1,80	0,20 (раствор В)	0,10 (раствор Е)	10,0
3	80,0	1,00	1,20	0,80 (раствор В)	0,10 (раствор Е)	10,0
4	100,0	1,00	1,00	1,00 (раствор В)	0,10 (раствор Е)	10,0
5	400,0	1,00	1,60	0,40 (раствор Б)	0,10 (раствор Е)	10,0
6	800,0	1,00	1,20	0,80 (раствор Б)	0,10 (раствор Е)	10,0

Далее градуировочные растворы проходят через все стадии пробоподготовки согласно п. 8.7 - 8.10

8.3 Установление градуировочной характеристики

Полученные по п. 8.2.4.7 растворы хроматографируют, начиная с самой низкой концентрации. При этом должны соблюдаться нижеследующие условия хроматографирования и параметры настройки масс-детектора.

8.3.1 Условия хроматографирования

Колонка хроматографическая ZORBAX SB-C_{18} (2,1 × 150 мм), зернение 3,5 мкм

Объем вводимой пробы — 20 мкл

Подвижная фаза состава — А (0,1 % раствор муравьиной кислоты), В (ацетонитрил)

Государственный институт технической информации и нормативной документации

Условия подачи подвижной фазы	градиентное элюирование: 0 - 11 мин / В от 0% до 60%; 11 - 16 мин / В 60%; 16 - 17 мин / В от 60% до 100%; 17 - 19 мин / В 100%; 19 - 20 мин / В от 100% до 0%; 20 - 28 мин / В 0%;
Скорость подачи подвижной фазы	0,3 $см^3$/мин
Температура термостата колонки	40°С

8.3.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Скорость потока газа десольвации	560 $дм^3$/час
Давление на небулайзере (распылителе)	241 $\times 10^{-3}$ Па
Температура газа десольвации	350 °С
Напряжение на капилляре	4000 В

В таблице 6 представлены параметры воздействия на ионы пенициллинов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Таблица 6 – Параметры воздействия на ионы пенициллинов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с регистрацией положительных ионов (+)

Аналит	«Родительский» ион, m/z	«Дочерние» ионы, m/z	Напряжение на фрагменторе, В	Энергия соударений, эВ
Амоксициллин	366,2	349,1 / 114	75	2 / 15
Ампициллин	350,2	160 / 106	95	5 / 15
Пенициллин G	335,2	176 / 160	80	10 / 15
Пенициллин G-d_7	342,2	183,2/160,1	90	10 / 15
Пенициллин V	351,2	160,1/114,1	75	5 / 35
Оксациллин	402,2	243 / 160	85	10 / 5
Клоксациллин	436,1	277,1/160,1	85	10 / 10
Нафциллин	415,2	256 / 199,2	95	10 / 5
Диклоксациллин	470,1	311 / 160	95	10 / 10

Перед работой необходимо проводить оптимизацию настроек масс-спектрометрического детектора, в том числе напряжения на фрагментаторе и энергии в ячейке соударения.

Количественные измерения проводятся по одному, наиболее интенсивному, дочернему иону, а по соотношению откликов дочерних ионов подтверждается достоверность определения, так как эта величина является постоянной.

8.4 Построение градуировочных графиков

Выполняется построение 2-х градуировочных графиков для каждого пенициллина.

Для градуировочного графика №1 устанавливают зависимость относительной площади пика (площадь пика анализируемого вещества, деленная на площадь пика внутреннего стандарта) от соответствующей относительной концентрации антибиотика (концентрация анализируемого

вещества, деленная на концентрацию внутреннего стандарта) в градуировочных растворах № 1 - 4, используя программное обеспечение Agilent MassHunter. Для построения градуировочного графика №2 устанавливают зависимость относительной площади пика от соответствующей относительной концентрации антибиотика в градуировочных растворах № 3 – 6. Градуировочный раствор № 0 используется для контроля за содержанием антибиотиков пенициллиновой группы в пищевой матрице.

По полученным данным методом наименьших квадратов рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой

$$y = bx + a, \quad (1)$$

где y - отношение площади пика каждого пенициллина к площади пика внутреннего стандарта;

x - отношение концентрации каждого пенициллина в градуировочном растворе к концентрации внутреннего стандарта;

a и *b*- коэффициенты регрессии.

8.5 Контроль градуировочного графика

Построение градуировочных графиков осуществляется каждый раз перед началом измерений. Контроль стабильности градуировочных графиков осуществляется в конце измерений по любой точке градуировочного графика, исключая первую и последнюю концентрации градуировочных растворов. Расхождение между измеренной концентрацией антибиотика в выбранном градуировочном растворе и его фактической концентрацией, выраженное в процентах, не должно превышать норматива контроля $К_{гр}$, установленного для каждого градуировочного графика. В приложении Б приведены рассчитанные значения $К_{гр}$ для некоторых видов пищевых продуктов.

В противном случае необходимо провести построение нового градуировочного графика.

8.6 Подготовка анализируемых образцов

Отбирают не менее 1 кг пробы пищевого продукта или продовольственного сырья в соответствии с требованиями [9] п.7.

Отобранные пробы хранят в холодильнике.

Усредненную пробу образца предварительно термостатируют при температуре (20 ± 5) °С.

8.7 Проведение пробоподготовки для анализа на содержание антибиотиков пенициллиновой группы жидких, пастообразных, твердых молочных продуктов (молоко, йогурт, сметана, сыр и т.д.)

К гомогенизированной навеске массой (1,000 - 1,500) ± 0,001 г пищевого продукта, содержащего животноводческое сырье, взвешенной в полипропиленовой пробирке объёмом 50 $см^3$, вносят 0,05 $см^3$ внутреннего стандарта (пенициллин $G–d_7$) концентрацией 1,0 мкг/$см^3$

(раствор Е, приготовленный по п. 8.2.4.6.). В пробирку приливают 2 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, затем добавляют 10 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 10 минут на электровстряхиватель для экстракции. Далее пробы центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 минут при температуре 5 ^{0}С. После центрифугирования отбирают надосадочную жидкость и переносят ее в новую полипропиленовую пробирку. Далее пробирку помещают на нагревательный модуль и упаривают ацетонитрильный экстракт на нагревательном модуле в токе воздуха при 40 ^{0}С до 0,4 - 0,7 $см^3$. К остатку приливают 5 $см^3$ фосфатного буферного раствора с pH 6,5 и 5 $см^3$ гексана, встряхивают в течение 5 мин. Далее содержимое пробирок отстаивается в течение 10 минут для достижения межфазного равновесия. Гексановую фракцию отбрасывают, отбирая верхний слой пипет-дозатором (полноту удаления гексана определяют общепринятыми методами – визуально по границе межфазного равновесия). Полученный водный экстракт очищают методом твердофазной экстракции на картриджах Cromabond HR-X, 3 $см^3$, 200 мг. Перед нанесением экстракта картридж кондиционируют последовательно 3 $см^3$ метанола и 3 $см^3$ деионизованной воды. После пропускания экстракта картридж промывают 3 $см^3$ деионизованной воды, сушат под вакуумом в течение 10 минут. Затем аналиты элюируют 3 $см^3$ ацетонитрила. Элюат упаривают на нагревательном модуле при 40 ^{0}С досуха. К сухому остатку приливают 1,0 $см^3$ деионизованной воды, помещают на встряхиватеь на 10 минут, затем фильтруют через мембранный шприцевой фильтр (13 мм, 0,2 мкм) из регенерированной целлюлозы в виалу. Полученный раствор используют для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

8.8 Проведение пробоподготовки для анализа на содержание антибиотиков пенициллиновой группы сухих молочных продуктов (сухое молоко, сухая детская молочная адаптированная смесь, спортивное питание и т.д.)

К гомогенизированной навеске массой (1,000 - 1,500) ± 0,001 г сухого пищевого продукта, содержащего животноводческое сырье, взвешенной в полипропиленовой пробирке объемом 50 $см^3$, вносят 0,05 $см^3$ внутреннего стандарта (пенициллин G–d_7) концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ (раствор Е, приготовленный по п. 8.2.4.6.). В пробирку приливают 7 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, затем добавляют 10 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 10 минут на электровстряхиватель для экстракции. Далее пробу центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 минут при температуре (5 ± 2) ^{0}С. После центрифугирования отбирают надосадочную жидкость и переносят ее в новую полипропиленовую пробирку. Далее пробирку помещают на нагревательный модуль и упаривают ацетонитрильный экстракт на нагревательном модуле в токе воздуха при 40 ^{0}С до 0,5 - 1,0 $см^3$. Обезжиривание и дальнейшая пробоподготовка осуществляется согласно п.8.7.

8.9 Проведение пробоподготовки для анализа на содержание антибиотиков пенициллиновой группы продуктов с высоким содержанием жира (масло, спред и т.д.)

К гомогенизированной навеске массой (1,000 - 1,500) ± 0,001 г пищевого продукта,

содержащего животноводческое сырье, взвешенной в полипропиленовой пробирке объемом 50 $см^3$, вносят 0,05 $см^3$ внутреннего стандарта (пенициллин G–d_7) концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ (раствор Е, приготовленный по п. 8.2.4.6.). В пробирку приливают 2 $см^3$ дистиллированной воды и 10 $см^3$ ацетонитрила, и перемешивают, затем добавляют 5 $см^3$ гексана и помещают на 10 минут на электровстряхиватель для экстракции. Далее пробы центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 минут при температуре 5 °С. После центрифугирования верхний гексановый слой отбрасывают, отбирают надосадочную жидкость и переносят ее в новую полипропиленовую пробирку. Далее пробирку помещают на нагревательный модуль и упаривают ацетонитрильный экстракт на нагревательном модуле в токе воздуха при 40 °С до 0,4 - 0,7 $см^3$. К остатку приливают 5 $см^3$ фосфатного буферного раствора с pH 6,5, встряхивают в течение 5 мин. Далее полученный водный экстракт очищают методом твердофазной экстракции на картриджах Cromabond HR-X, 3 $см^3$, 200 мг согласно п. 8.7.

8.10 Проведение пробоподготовки для анализа на содержание антибиотиков пенициллиновой группы мяса, мясных продуктов, субпродуктов и продуктов на их основе.

К гомогенизированной навеске массой (1,000 - 1,500) ± 0,001 г пищевого продукта, содержащего животноводческое сырье, взвешенной в полипропиленовой пробирке объемом 50 $см^3$, вносят 0,10 $см^3$ внутреннего стандарта (пенициллин G–d_7) концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ (раствор Е, приготовленный по п. 8.2.4.6.). В пробирку приливают 2 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают, затем добавляют 10 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 10 минут на электровстряхиватель для экстракции. Далее пробы центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 минут при температуре 5 °С. После центрифугирования отбирают надосадочную жидкость и переносят ее в новую полипропиленовую пробирку. Далее пробирку помещают на нагревательный модуль и упаривают ацетонитрильный экстракт на нагревательном модуле в токе воздуха при 40 °С до 0,4 - 0,7 $см^3$. Обезжиривание и дальнейшая пробоподготовка осуществляется согласно п.8.7.

9 Выполнение измерений

Анализ полученных по п. 8.7 – 8.10 фильтратов проводят на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором. Условия хроматографирования и параметры настройки масс-детектора такие же, как и при построении градуировочного графика п. 8.3. Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб.

ВЭЖХ-МС анализ образцов должен выполняться в виде серии измерений включающей: 1) градуировочные растворы, 2) исследуемый образец, 3) образцы контроля стабильности градуировки (QC).

Результаты измерений округляют до второго знака после запятой и выражают в мкг/кг.

Если массовая доля аналита в анализируемой пробе превышает значение максимального градуировочного уровня, то анализ повторяют с уменьшенной в 2 - 5 раз навеской.

10 Обработка результатов измерений

Расчет концентрации каждого пенициллина, *X,* мкг/кг, проводят по формуле:

$$X = \frac{C_{отн} \times C_{вн.ст.} \times V}{m} \quad (2)$$

где, $C_{отн}$ – отношение концентрации пенициллина к концентрации внутреннего стандарта, найденное по градуировочному графику, ($C_i/C_{вн.ст.}$) нг/см^3;

$C_{вн.ст.}$ – концентрация внутреннего стандарта пенициллина, нг/см^3;

m – масса навески, г;

V – объем разведения сухого остатка, 1,0 см^3.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений. Вычисления проводят до третьего знака после запятой и округляют до второго.

Допустимые расхождения между параллельными определениями по отношению к величине среднего арифметического значения не должны превышать предела повторяемости r, значения которого указаны а приложении Б (таблицы Б.1-Б.5).

Результат анализа $\overline{X}$, представляют в следующем виде:

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (3)$$

где X_1 – результат первого параллельного определения;

X_2 – результат второго параллельного определения;

Если хотя бы одно из значений концентрации определяемого пенициллина окажется меньше нижней границы диапазона измерений, то вычисления по формуле (2) не производят, а дается результат в виде $X < C_{LOQ}$, где (C_{LOQ}) – нижний предел измерения методики.

Гарантированный результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде:

$$(\overline{X} \pm U(X)), \text{ мкг/кг}, \quad (4)$$

где $\overline{X}$ - среднее арифметическое из результатов измерений 2-х параллельных проб, полученное в соответствии с п.9 и рассчитанное согласно п.10;

U(X) – абсолютное значение максимальной расширенной неопределенности. Рассчитывается по формуле:

$$U(X) = U \times 0{,}01 \times \overline{X}, \quad (5)$$

где *U* – относительное значение максимальной расширенной неопределенности (приложение Б, таблицы Б1-Б5).

11 Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных.

Результаты должны включать следующую информацию:

- Наименование (шифр) пробы;
- Дату проведения измерений;
- Результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
- Результаты параллельных определений;
- Окончательный результат измерений;
- Фамилию оператора.

12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости осуществляют согласно п. 5.2.2.1 [12]. Два результата испытаний должны быть получены в условиях повторяемости.

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами единичных наблюдений $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости $r_{абс.}$ Абсолютное значение предела повторяемости $r_{абс.}$, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$r_{абс} = 0{,}01 \cdot r \cdot \overline{X} \qquad (6)$$

где 0,01 – коэффициент пересчета из процентов;

$\overline{X}$ – среднее арифметическое значение двух результатов единичных наблюдений, мкг/кг;

r – относительное значение предела повторяемости, %, указанное в таблицах Б.1 – Б.5.

Если для значения абсолютного расхождения между двумя результатами единичных наблюдений выполняется условие

$$|X_1 - X_2| \langle r_{абс} \ , \qquad (7)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\overline{X}$, рассчитанное по формуле (3).

Если абсолютное значение разности превышает значение $r_{абс}$, то следует получить еще два результата. Если размах четырех результатов испытаний равен или меньше критического размаха (формула 8), то среднее арифметическое четырех результатов (формула 10) должно указываться как конечный заявляемый результат.

$$|X_{\max} - X_{\min}| \le CR_{0,95}, \qquad (8)$$

где $CR_{0,95} = 3{,}6 \times s_r$ (9)

$$s_r = 0{,}01 \cdot s_{r\%} \cdot \overline{X}$$

Значения $s_{r\%}$ представлены в таблицах Б.1 – Б.5 приложения Б.

$$\overline{X}_{ок} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4}{4} \quad (10)$$

Если данное условие не выполняется, то следует отказаться от полученных данных, выяснить и устранить причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, осуществляют согласно [12].

После проверки полученных результатов параллельных определений по критерию повторяемости по п.12 рассчитывают среднее арифметическое $\overline{\overline{X}}$ двух результатов измерений $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ соответственно, мкг/кг:

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \quad (11)$$

где $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ - средние значения, рассчитанные на основании двух параллельных измерений, вычисленные по формуле (3) в условиях промежуточной прецизионности.

Рассчитывают абсолютную разность результатов $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$, и сравнивают с абсолютным значением предела промежуточной прецизионности $CR_{абс}$.

$$CR_{абс} = 0{,}01 \cdot CR_{0,95} \cdot \overline{\overline{X}} \quad (12)$$

где 0,01 – коэффициент для пересчета процентов;

$$CR_{0,95} = \sqrt{r^2_{I(TO)} - \frac{r^2}{2}}, \quad (13)$$

где r и $r^2_{I(TO)}$ - относительные значения пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, указанные в таблице 2.

Если для значения абсолютного расхождения между результатами выполняется условие

$$\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| < CR_{абс}, \quad (14)$$

то оба конечных результата, полученные в условиях промежуточной прецизионности, считаются приемлемыми и среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (11), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

При превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля промежуточной прецизионности.

14 Проверка стабильности результатов измерений

Стабильность результатов измерений проверяется с использованием контрольной карты Шухарта (R-карта размахов по ИСО 8258) в соответствии с [12] п.6.2.2.

При построении контрольной карты используют контрольную рабочую пробу стабильную во времени (например, пищевой продукт с внесением пенициллина, соответствующий области

применения данной методики с установленным сроком годности). Содержание пенициллина в контрольной рабочей пробе должно соответствовать диапазону измерений. Контрольная рабочая проба должна храниться в условиях, обеспечивающих стабильность концентрации пенициллина во времени.

Рассчитывают:

- центральную линию: $d_2 \times s_r$,

где $d_2 = 1{,}128$ (коэффициент для расчета центральной линии для n=2);

- границы регулирования: $UCL = D_2 \times s_r$,

где $D_2 = 3{,}686$ (коэффициент для расчета границы регулирования для n=2);

- предупреждающие границы: $UCL = D_2(2) \times s_r$,

где $D_2(2) = 2{,}834$ (коэффициент для расчета предупреждающих границ для n=2);

s_r – стандартное отклонение повторяемости, % (таблицы Б.1 – Б.5).

Оценку стандартного отклонения повторяемости s_r за отчетный период (20 – 30 измерений) получают по формуле:

$$s_r = \left(\frac{\sum_1^L w_i}{L} \right) / d_2 = \overline{w} / d_2 \quad , \qquad (15)$$

где $w_i = \frac{|X_{1i} - X_{2i}|}{X_{cpi}} \times 100\%$ - размах;

X_{1i} и X_{2i} – результаты первого и второго определения для i-ой пары, мкг/кг;

X_{cpi} - среднее значение результатов первого и второго определений для i-ой пары, мкг/кг

L – количество пар проведенных измерений за отчетный период (20 - 30 измерений).

Полученные значения заносят в лист данных контрольной карты:

Дата проведения анализа	Наблюдаемые значения			Размах w, %	Описание
	X_1	X_2	$X_{ср}$		
				Сумма	
				Среднее значение	$\overline{w}/d_2$

Графически по оси X откладывают дату проведения анализа, по оси Y – размах w. Также отмечают центральную линию и линии предупреждающей и регулирующей границ.

Интерпретацию результатов проводят в соответствии с требованиями [12] п.6.

Методика разработана лабораторией химии пищевых продуктов Государственного предприятия «НПЦГ» МЗ РБ.

Разработчики:

Заведующая лабораторией, к.х.н. О.В. Шуляковская

Старший научный сотрудник Л.Л. Белышева

Старший научный сотрудник, к.х.н. Е.И.Полянских

Научный сотрудник Е.П. Шупилова

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(обязательное)

Нормативные ссылки

1 СТБ ИСО 5725 – 2 - 2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений в 6 ч. – Ч. 2: Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода определений.

2 СТБ ИСО 5725 – 3 - 2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений в 6 ч. – Ч. 3: Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений.

3 СТБ ИСО 5725 – 4 - 2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений в 6 ч. – Ч. 4: Основные методы определения правильности стандартного метода определений.

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

5 ГОСТ 12.2.003-91. Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.

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

7 ППБ 1.04 - 2002. Инструкции «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях». – М.: Химия, 1979 г. ; Общие правила пожарной безопасности Республики Беларусь для общественных зданий и сооружений»

8 ГОСТ 15150-69. Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды.

9 СТБ 1036-97. Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.

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

11 ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки.

12 ГОСТ 245-76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия.

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

14 ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

15 ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(обязательное)

Показатели прецизионности, расширенной неопределенности и нормативы контроля градуировочных графиков методики, установленные при метрологической аттестации методики

В приложении Б представлены установленные показатели прецизионности, расширенной неопределенности и нормативы контроля градуировочных графиков методики, установленные при метрологической аттестации методики, которые могут быть использованы при выполнении измерений и проведении проверки приемлемости результатов измерений в условиях повторяемости и промежуточной прецизионности: для молока и молочных продуктов (таблицы Б.1-Б.3), для мяса и мясных продуктов (таблицы Б.4-Б.5).

Таблица Б.1 – Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95 для **молока сырого**

Наименование антибиотика	$К_{гр}$		Показатель повторяемости s_r,%	Показатель промежуточной прецизионности $s_{R(TO)}$,%	Предел повторяемости r,%	Предел промежуточной прецизионности $r_{R(TO)}$,%	Расширенная неопределенность измерения, U, %
	2 – 20 мкг/кг	10 -100 мкг/кг					
Амоксициллин	12,5	10,8	7,4	8,1	20,7	22,7	31,4
Ампициллин	13,8	12,1	6,6	9,5	18,5	26,6	29,2
Пенициллин G	8,9	6,2	7,3	7,7	20,4	21,6	28,6
Пенициллин V	8,7	7,4	6,4	8,7	17,9	24,4	27,2
Оксациллин	6,6	7,4	7,7	9,2	21,6	25,8	24,6
Клоксациллин	5,3	10,5	8,4	8,8	23,5	24,6	28,2
Нафциллин	8,4	11,7	5,3	9,1	14,8	25,5	27,0
Диклоксациллин	10,3	9,9	8,9	9,1	24,9	25,5	26,6

Таблица Б.2 – Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95 для **детской адаптированной молочной смеси Friso**

Наименование антибиотика	$К_{гр}$		Показатель повторяемости s_r,%	Показатель промежуточной прецизионности $s_{R(TO)}$,%	Предел повторяемости r,%	Пределпромежуточной прецизионности $r_{R(TO)}$,%	Расширенная неопределенность измерения, U, %
	2 – 20 мкг/кг	10 -100 мкг/кг					
Амоксициллин	13,6	13,2	6,4	7,5	17,9	21,0	32,4
Ампициллин	15,6	14,6	8,0	9,1	22,4	25,5	34,8
Пенициллин G	12,9	11,5	5,7	8,3	16,0	23,2	30,6
Пенициллин V	10,0	9,2	4,6	6,5	12,9	18,2	27,2
Оксациллин	14,1	8,5	5,3	7,5	14,8	21,0	32,4
Клоксациллин	12,8	8,0	5,9	6,9	16,5	19,3	31,2
Нафциллин	11,2	10,9	7,1	8,1	19,9	22,7	29,2
Диклоксациллин	10,5	9,8	5,1	5,7	14,3	16,0	28,0

Таблица Б.3 – Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95 для **сыра плавленого**

Наименование антибиотика	$К_{гр}$		Показатель повторяемости s_r,%	Показатель промежуточной прецизионности $s_{итоги}$,%	Предел повторяемости r,%	Предел промежуточной прецизионности $r_{(ITO)}$,%	Расширенная неопределенность измерения, U, %
	2 – 20 мкг/кг	10 -100 мкг/кг					
Амоксициллин	14,9	14,1	8,9	9,0	24,9	25,2	37,8
Ампициллин	13,1	12,8	6,0	6,9	16,8	19,3	31,2
Пенициллин G	13,8	7,5	6,5	7,0	18,2	19,6	32,4
Пенициллин V	13,8	10,9	6,6	8,7	18,5	24,4	32,6
Оксациллин	12,8	9,9	5,1	7,2	14,3	20,2	29,6
Клоксациллин	10,7	10,6	7,7	9,8	21,6	27,4	31,8
Нафциллин	12,2	11,4	7,1	9,0	19,9	25,2	31,6
Диклоксациллин	14,2	12,5	5,5	9,6	15,4	26,9	32,6

Таблица Б.4 – Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95 для **мяса (свинина))**

Наименование антибиотика	$К_{гр}$		Показатель повторяемости s_r,%	Показатель промежуточной прецизионности $s_{итоги}$,%	Предел повторяемости r,%	Предел промежуточной прецизионности $r_{(ITO)}$,%	Расширенная неопределенность измерения, U, %
	10 – 100 мкг/кг	80 -800 мкг/кг					
Амоксициллин	16,2	24,9	5,2	6,8	14,6	19,0	33,4
Ампициллин	13,3	21,4	5,3	7	14,8	19,6	30,4
Пенициллин G	10,6	12,2	4,2	4,9	11,8	13,7	26,0
Пенициллин V	9,6	12,7	4,3	4,4	12,0	12,3	25,8
Оксациллин	13,2	18,2	4,7	6,8	13,2	19,0	29,4
Клоксациллин	12,1	17,9	4,6	6,8	12,9	19,0	28,2
Нафциллин	11,1	16,4	5,3	7,6	14,8	21,3	27,0
Диклоксациллин	9,8	12,9	3,2	6,4	9,0	17,9	25,0

Таблица Б.5 – Нормативы контроля градуировочных графиков, относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95 для **печени**

Наименование антибиотика	$К_{гр}$		Показатель повторяемости s_r,%	Показатель промежуточной прецизионности $s_{итоги}$,%	Предел повторяемости r,%	Предел промежуточной прецизионности $r_{(ITO)}$,%	Расширенная неопределенность измерения, U, %
	10 – 100 мкг/кг	80 -800 мкг/кг					
Амоксициллин	13,0	17,7	4,9	8,3	13,7	23,2	27,8
Ампициллин	11,8	13,6	7,6	8,9	21,3	24,9	27,8
Пенициллин G	12,3	9,9	5,8	6,1	16,2	17,1	27,0
Пенициллин V	10,9	13,9	4,2	6,2	11,8	17,4	25,5
Оксациллин	8,2	9,6	4,8	6,9	13,4	19,3	22,4
Клоксациллин	10,8	10,1	4,3	8,1	12,0	22,7	25,9
Нафциллин	11,1	16,4	5,7	5,7	16,0	16,0	25,5
Диклоксациллин	9,8	12,9	6,6	6,8	18,5	19,0	24,5

Отдел технической информации и нормативной документации

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

Пример методики расчета неопределенности измерений

В.1 Описание измеряемой величины

Измерение содержания антибиотиков пенециллиновой группы в пищевых продуктах согласно МВИ включает следующие операции:

- Отбор навески анализируемой пробы;
- Выделение пенициллинов смесью ацетонитрил : вода из пищевой матрицы;
- Отгонку ацетонитрила, растворение остатка в фосфатном буферном растворе с pH 6,5;
- Обезжиривание пробы с помощью гексана;
- Доочистку пробы и концентрирование пенициллинов с помощью твердофазной экстракции;
- Фильтрацию элюата через мембранный фильтр миллипоре;
- Хроматографирование на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором.

Математическая модель измерений выражается соотношением:

$$X = \frac{C_{отн} \times C_{вн.ст.} \times V}{m \times F_{Rec}} \times F_{Rep} \qquad (109)$$

где $C_{отн}$ – отношение концентрации пенициллина к концентрации внутреннего стандарта, найденное по градуировочному графику, ($C_i/C_{вн.ст.}$) нг/см^3;

$C_{вн.ст.}$ – концентрация внутреннего стандарта пенициллина, нг/см^3;

m – масса навески г;

V – объем разведения сухого остатка 1,0 см^3;

F_{Rec} – фактор степени извлечения;

F_{Rep} – фактор повторяемости.

Исходя из полученной модели, неопределенность измеренной массовой концентрации каждого пенициллина включает следующие основные составляющие:

а) неопределенность, обусловленную случайными факторами (фактор повторяемости);

б) неопределенность, обусловленную построением и использованием градуировочной характеристики (ГХ);

в) неопределенность, обусловленную степенью извлечения;

г) другие составляющие неопределенности, не учтенные при исследовании прецизионности и смещения.

Белорусский государственный институт ... Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Далее представлен расчет максимальной расширенной неопределенности на примере исследований, проведенных для детской адаптированной молочной смеси Friso.

В.2 Оценивание относительной стандартной неопределенности, обусловленной случайными факторами

Учитывая, что результат измерения получают усреднением результатов двух параллельных определений, оценку относительной стандартной неопределенности (ОСН) рассчитывали по формуле:

$$u_{F_{rep}} = \frac{S_r}{\sqrt{2}} \qquad \text{(В.2)}$$

Относительные стандартные неопределенности, обусловленные случайными факторами (для детской адаптированной молочной смеси Friso) представлены в таблице1.

Таблица В.1 - Относительные стандартные неопределенности, обусловленные случайными факторами (для детской адаптированной молочной смеси Friso)

Наименование антибиотика	Показатель повторяемости, % S_r	Относительная стандартная неопределенность, % u_{Frep}
Амоксициллин	6,4	4,53
Ампициллин	8,0	5,66
Клоксациллин	5,9	4,17
Диклоксациллин	5,1	3,61
Нафциллин	7,1	5,02
Оксациллин	5,3	3,75
Пенициллин G	5,7	4,03
Пенициллин V	4,6	3,25

3 Оценивание относительной стандартной неопределенности, обусловленной степенью извлечения

При метрологической аттестации методики установлено, что максимальные значения относительной стандартной неопределенности, обусловленной степенью извлечения для детской адаптированной молочной смеси Friso следующее:

Таблица В.2 – Максимальные значения относительной стандартной неопределенности степени извлечения (для детской адаптированной молочной смеси Friso)

Наименование антибиотика	$u_{извл.}$, %
Ампициллин	1,73
Амоксициллин	2,03
Пенициллин G	1,61
Пенициллин V	1,53
Оксациллин	1,70
Клоксациллин	1,82
Диклоксациллин	1,80
Нафциллин	1,78

В.4 Оценивание неопределенности, обусловленной построением и использованием градуировочной характеристики (ГХ)

При метрологической аттестации методики установлены значения относительной стандартной неопределенности, обусловленной построением и использованием градуировочной характеристики (ГХ). Результаты для детской адаптированной молочной смеси Friso представлены в таблицах В.3.

Таблица В.3 – Стандартные неопределенности обусловленные построением и использованием градуировочной характеристики (ГХ) для детской адаптированной молочной смеси Friso

Наименование антибиотика	$u_{гх}$, %
Ампициллин	16,4
Амоксициллин	15,4
Пенициллин G	14,7
Пенициллин V	13,1
Оксациллин	15,7
Клоксациллин	14,9
Диклоксациллин	13,4
Нафциллин	13,6

В.5 Оценивание других составляющих неопределенности

Математическая модель измерения, кроме представленных выше входных величин, оцененных по имеющимся данным по прецизионности и извлечению метода, включает составляющие неопределенности, связанные с пробоподготовкой $u_п$.

Значение $u_п$ составляет:

$$u_n = \sqrt{u_{nm}^2 + u_{nV}^2}\,, \qquad (В.3)$$

где u_{nm} – ОСН, связанная с взвешиванием пробы;

u_{nV} – ОСН, связанная с измерением общего объема экстракта $u_{nV(1см^3)}$.

Значение u_{nm} вычисляется по формуле:

$$u_{nm} = \frac{u_{весы}}{m} \times 100\% \qquad (В.4)$$

где m - минимальная навеска для анализа 1000 мг;

Исходя из того, что при взвешивании применялись весы лабораторные электронные с погрешностью взвешивания ± 0,3 мг, вычисляем $u_{весы}$ по формуле:

$$u_{весы} = \frac{0{,}3}{\sqrt{3}} \times \sqrt{2} = 0{,}2449 \qquad (В.5)$$

$$u_{nm} = \frac{u_{весы}}{m} \times 100 = \frac{0{,}2449}{1000} \times 100 = 0{,}024495\% \qquad (В.6)$$

Значение u_{nV} вычисляется по формуле:

$$u_{nV} = \sqrt{u_{Vo}^2 + u_{Vt}^2} \quad \text{(B.7)}$$

Оценивалась стандартная неопределенность объема пипетки 1 см^3, исходя из предположения, что температура в лаборатории колебалась в пределах (20±5)°С, а коэффициент расширения воды 0.000207.

$$u_{Vo} = \frac{\Delta_V}{\sqrt{6}} = \frac{0{,}01}{2{,}45} = 0{,}004082 \quad \text{(B.8)}$$

$$u_{Vt} = \frac{0{,}000207 \times 5 \times 1}{\sqrt{3}} = 0{,}000598 \quad \text{(B.9)}$$

$$u_{IV} = \sqrt{0{,}004082^2 + 0{,}000598^2} = 0{,}00412556 \quad \text{(B.10)}$$

$$u_{IV\,(\%)} = \frac{0{,}00412556}{1} \times 100\% = 0{,}412556\% \quad \text{(B.11)}$$

$$u_i = \sqrt{0{,}024495^2 + 0{,}412556^2} = 0{,}413\% \quad \text{(B.12)}$$

В таблице В.4 представлен бюджет неопределенности измерений, рассчитанные для проб с содержанием антибиотиков пенициллиновой группы в указанном диапазоне измеряемых концентраций, рассчитанный для детской адаптированной молочной смеси Friso.

Таблица В.4 - Бюджет неопределенности измерений, рассчитанный для пробы с содержанием антибиотиков пенициллиновой группы в диапазоне измеряемых концентраций 2 -100 мкг/кг (детской адаптированной молочной смеси Friso)

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %	
ампициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,66
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,73
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	16,4
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	17,4
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**34,8**
амоксициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,53
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,03
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	15,4
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	16,2
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**32,4**
пенициллин G			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,03
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,61
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,7

Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	15,3
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**30,6**
пенициллин V			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,25
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,53
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,1
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	13,6
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**27,2**
оксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,75
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,70
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	15,7
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	16,2
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**32,4**
клоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,17
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,82
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,9
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	15,6
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**31,2**
диклоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,61
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,80
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,4
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	14,0
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**28,0**
нафциллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,02
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,78
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,6
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	14,6
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,2**

Аналогичным образом рассчитаны бюджеты неопределенности измерений для молока сырого, сыра плавленого, мяса (свинине), печени. Данные представлены в таблицах В.5 – В.8.



Таблица В.5 - Бюджет неопределенности измерений, рассчитанный для пробы с содержанием антибиотиков пенициллиновой группы в диапазоне измеряемых концентраций 2 -100 мкг/кг (для молока сырого)

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %	
ампициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,67
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,55
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	15,2
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	16,1
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**32,2**
амоксициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,23
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,13
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,6
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	15,7
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**31,4**
пенициллин G			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,16
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,06
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,1
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	13,3
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**26,6**
пенициллин V			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,53
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,29
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,1
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	13,1
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**26,2**
оксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,44
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,42
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	11,2
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	12,7
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**25,4**
клоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,94
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,31

Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,5
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	14,9
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,8**
диклоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	6,29
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,39
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,2
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	14,8
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,6**
нафциллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,75
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,44
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,9
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	14,6
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,2**

Таблица В.6 - Бюджет неопределенности измерений, рассчитанный для пробы с содержанием антибиотиков пенициллиновой группы в диапазоне измеряемых концентраций 2 -100 мкг/кг (сыра плавленого)

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %	
ампициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,24
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,83
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,9
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	15,6
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**31,2**
амоксициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	6,29
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,69
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	17,7
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	18,9
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**37,8**
пенициллин G			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,60
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,60
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	15,4
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	16,2

Расширенная неопределенность (k=2)		U	**32,4**
пенициллин V			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,67
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,66
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	15,5
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	16,3
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**32,6**
оксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,61
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,73
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,2
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	14,8
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,6**
клоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,44
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,80
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,8
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	15,9
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**31,8**
диклоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,89
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,97
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	15,7
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	16,3
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**32,6**
нафциллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,02
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,65
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,9
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	15,8
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**31,6**

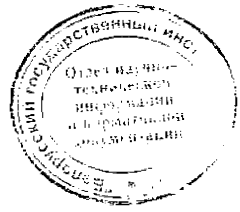


Таблица В.7 - Бюджет неопределенности измерений, рассчитанный для пробы с содержанием антибиотиков пенициллиновой группы в диапазоне измеряемых концентраций 10 - 800 мкг/кг (мяса (свинина))

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %	
ампициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,75
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,28
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,5
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	15,2
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**30,4**
амоксициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,68
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,17
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	16,1
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	16,7
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**33,4**
пенициллин G			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	2,97
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,90
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,5
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	13,0
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**26,0**
пенициллин V			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,04
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,83
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,4
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	12,9
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**25,8**
оксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,32
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,26
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,1
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	14,7
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,4**
клоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,25
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,07

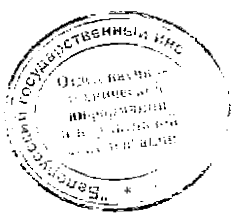
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,6
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	14,1
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**28,2**
диклоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	2,26
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,82
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,2
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	12,5
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**25,0**
нафциллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,75
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,81
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,8
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	13,5
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**27,0**

Таблица В.8 - Бюджет неопределенности измерений, рассчитанный для пробы с содержанием антибиотиков пенициллиновой группы в диапазоне измеряемых концентраций 10 - 800 мкг/кг (печени)

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %	
ампициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	5,37
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,46
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,5
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	14,6
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,2**
амоксициллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,46
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	1,44
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	14,2
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	14,7
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**29,4**
пенициллин G			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,10
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,29
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,5
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	14,3

Расширенная неопределенность (k=2)		U	**28,6**
пенициллин V			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	2,97
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,31
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,1
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	13,6
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**27,2**
оксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,39
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,56
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	11,5
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	12,3
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**24,6**
клоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	3,04
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	3,0
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	13,4
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	14,1
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**28,2**
диклоксациллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,67
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,54
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,2
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	13,3
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**26,6**
нафциллин			
Повторяемость результатов измерений	A	$u_{(Frep)}$	4,03
Обработка пробы	B	$u_п$	0,24
Извлечение	A	u(Rec)	2,13
Построение и использование градуировочной характеристики	A	$u_{гх}$	12,8
Суммарная стандартная неопределенность*)		u_c	13,5
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**27,0**

*) Суммарная стандартная неопределенность вычисляется по формуле: $u_c = \sqrt{\sum u_i^2}$

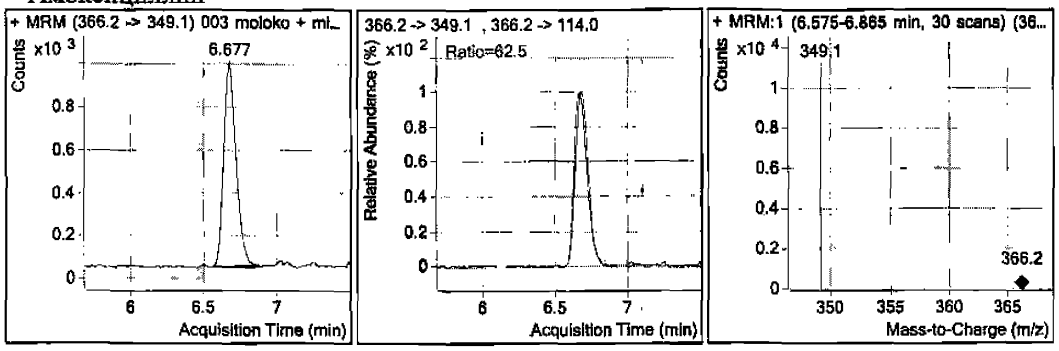


ПРИЛОЖЕНИЕ Г

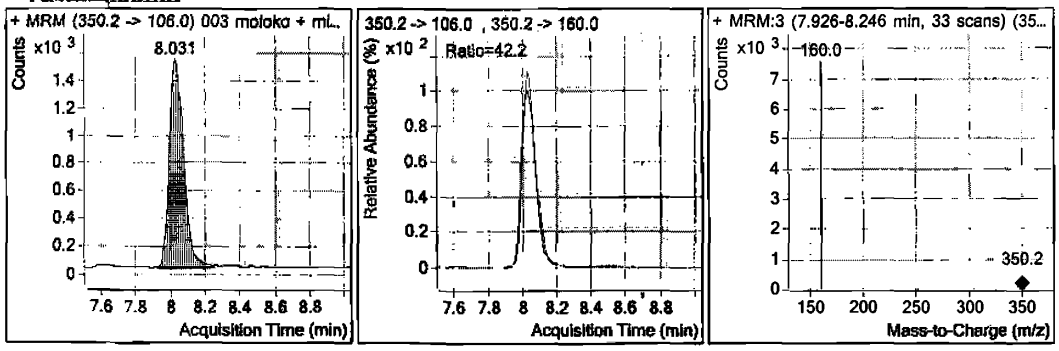
(обязательное)

Примеры хроматограмм

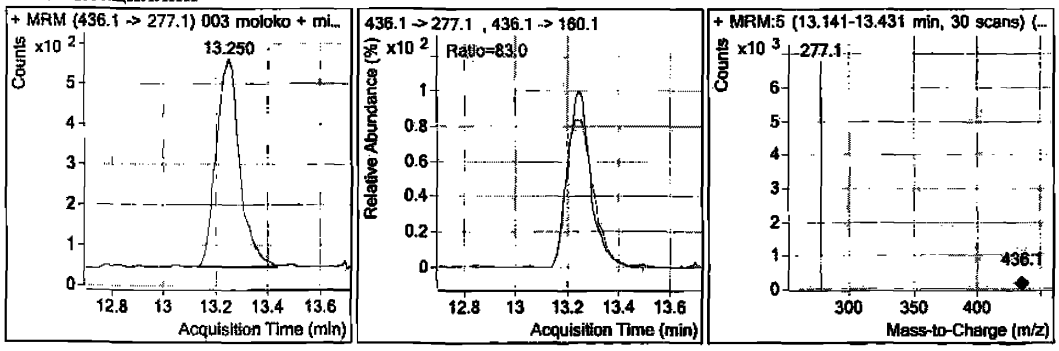
Амоксициллин



Ампициллин

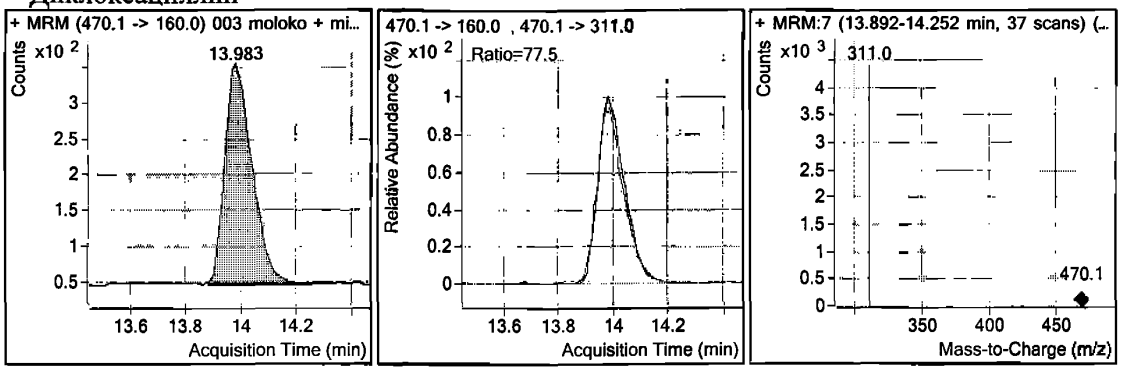


Клоксациллин

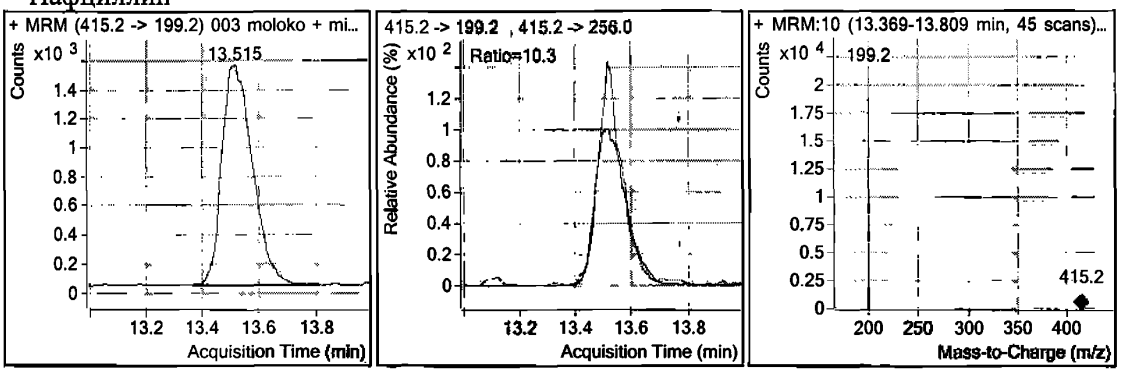


Белорусский государственный ин...
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

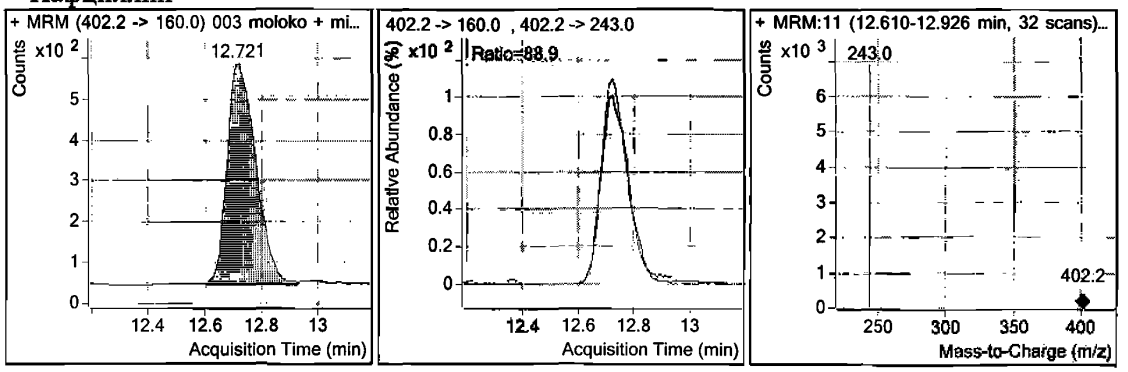
Диклоксациллин



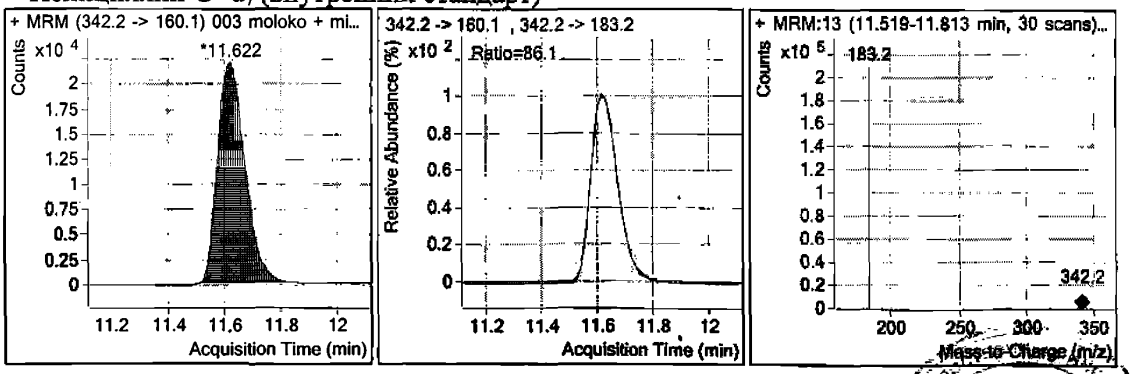
Нафциллин



Нафциллин



Пенициллин G- d_7 (внутренний стандарт)



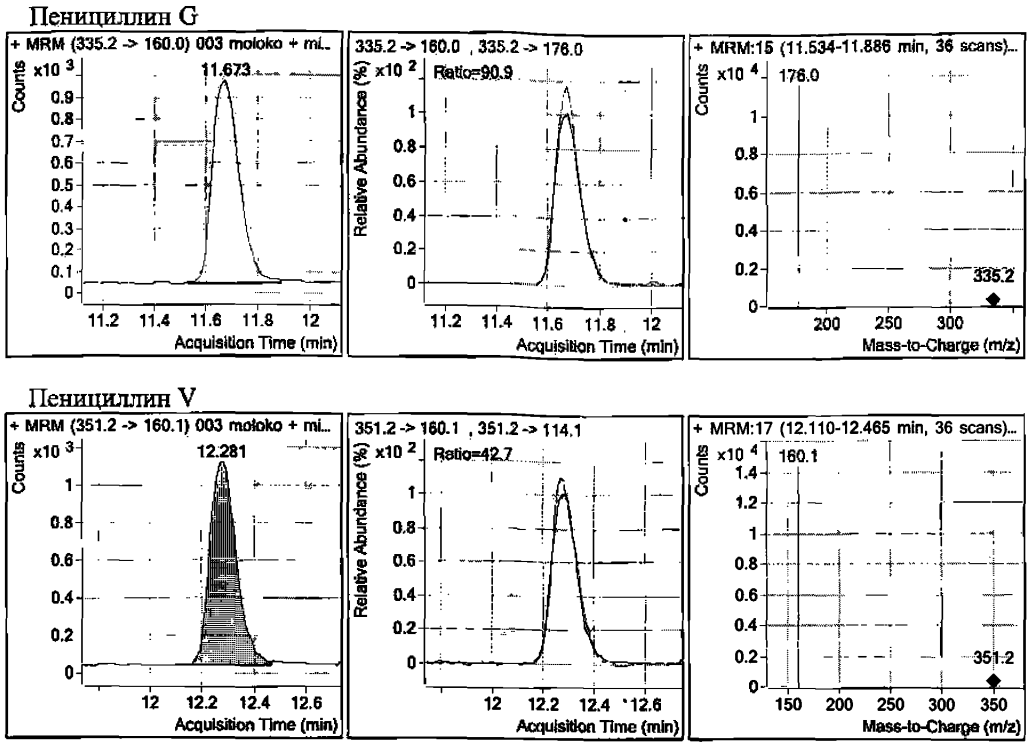


Рисунок Г.1 - Хроматограммы и масс-спектры, полученные при анализе пробы молока сырья с внесенным содержанием антибиотиков пенициллиновой группы 2 мкг/кг и содержащей внутренний стандарт пенициллин G-d_7 концентрацией 50 нг/см^3

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии»
(БелГИМ)

СВИДЕТЕЛЬСТВО О МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ ПОДТВЕРЖДЕНИИ ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ (МВИ) № 883МШ/2015

Обозначение и наименование методики выполнения измерений: **МВИ.МН 5200-2015** «Определение содержания остаточных количеств пенициллинов в сырье животного происхождения и пищевых продуктах методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика выполнения измерений»

Заявитель: Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»

Разработчик: Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»

Методика выполнения измерений соответствует требованиям, установленным в ГОСТ 8.010-99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения».

Свидетельство о метрологическом подтверждении пригодности методики выполнения измерений выдано на основании экспертного заключения по результатам метрологической экспертизы от 26.04. 2015 г.

Заместитель директора по науке Т.А. Коломиец

ОКПО 02568454
УНН 100055197

ДЗЯРЖАЎНЫ КАМІТЭТ ПА СТАНДАРТЫЗАЦЫІ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

Рэспубліканскае унітарнае прадпрыемства
“БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ ІНСТЫТУТ МЕТРАЛОГІІ”
- БелДІМ -

Старавіленскі тракт 93, г. 220053, Мінск,
Тэлэфон (017) 233 55 01 Факс (017) 288 09 38
Эл. пошта: gost.e-ecolog.ru

Разліковы рахунак: 3012102776014, (RUR): 3012102776027
Рэгіянальная Дырэкцыя №700 ОАО «БПС-Сбербанк»,
БІК 153001369, праспект Машэрава, 80,
УНП 100055197, АКПА 02568454

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Республиканское унитарное предприятие
“БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ МЕТРОЛОГИИ”
- БелГИМ -

Старовиленский тракт 93, 220053, Минск
Телефон +375 17 233 55 01 Факс +375 17 288 09 38
Эл. почта: gost.e-ecolog.ru

Расчётный счёт: 3012102776014, (RUR): 3012102776027
Региональная Дирекция №700 ОАО «БПС-Сбербанк»,
БИК 153001369, проспект Машерова, 80,
УНП 100055197, ОКПО 02568454

25.04. 2015г. № 28-12/5036

На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 883/2015
об аттестации МВИ

Определение содержания остаточных количеств пенициллинов в сырье животного происхождения и пищевых продуктах методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика выполнения измерений

Методика выполнения измерений, разработанная Республиканским унитарным предприятием «Научно-практический центр гигиены» и регламентированная в ***МВИ.МН 5200-2015 «Определение содержания остаточных количеств пенициллинов в сырье животного происхождения и пищевых продуктах методом ВЭЖХ-МС/МС. Методика выполнения измерений»***, аттестована в соответствии с ГОСТ 8.010-99.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по разработке и экспериментальному исследованию МВИ.

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками:

1 При количественном определении остаточных количеств антибиотиков пенициллиновой группы в молоке и молочных продуктах

Наименование антибиотика	Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг	Стандартное отклонение повторяемости S_r, %	Стандартное отклонение промежуточной прецизионности $S_{I(TO)}$, %	Расширенная неопределенность измерений U^*, %
амоксициллин	От 2 до 100 вкл.	8	8	34
ампициллин		7	9	32
пенициллин G		7	8	31
пенициллин V		6	8	29
оксациллин		6	8	29
клоксациллин		7	9	30
нафциллин		7	9	29
диклоксациллин		7	8	29

*) Значения расширенной неопределенности получены на основании стандартной неопределенности и коэффициента охвата k=2, который соответствует вероятности охвата примерно 95 %

2 При количественном определении остаточных количеств антибиотиков пенициллиновой группы в мясе и мясных продуктах

Наименование антибиотика	Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг	Стандартное отклонение повторяемости S_r, %	Стандартное отклонение промежуточной прецизионности $S_{I(TO)}$, %	Расширенная неопределенность измерений U^*, %
амоксициллин	От 10 до 800 вкл.	5	8	31
ампициллин		6	8	29
пенициллин G		5	6	27
пенициллин V		4	5	26
оксациллин		5	7	26
клоксациллин		4	7	27
нафциллин		6	7	26
диклоксациллин		5	7	25

*) Значения расширенной неопределенности получены на основании стандартной неопределенности и коэффициента охвата k=2, который соответствует вероятности охвата примерно 95 %

Заместитель директора по науке Т.А. Коломиец

gost.e-ecolog.ru