СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора БелГИМ

_____Т.А. Коломиец

_____2013 г

УТВЕРЖДАЮ

Директор
ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»

_____С.И. Сычик

«20» 01 2014 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ЛЕВОМИЦЕТИНА (ХЛОРАМФЕНИКОЛА) В СЫРЬЕ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

МВИ МН 4790-2013

МВИ аттестована
РУП "Белорусский государственный институт метрологии"
Свидетельство об аттестации
№ 809/2013
от "29" 11 2013 г.

Минск 2013

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

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

Всероссийский государственный институт мяса
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

1 Область применения

Методика предназначена для идентификации и количественного определения остаточных количеств левомицетина (хлорамфеникола) в сырье животного происхождения и пищевых продуктах.

Метод основан на экстракции левомицетина этилацетатом, отгонке растворителя, растворении остатка в дистиллированной воде, 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.

Диапазон определяемых концентраций левомицетина – 0,2– 1,0 мкг/кг.

Нижний предел измерения методики (LOQ) составляет 0,2 мкг/кг.

2 Показатели прецизионности методики

Относительные значения показателей прецизионности (повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности) и максимальной расширенной неопределенности при доверительной вероятности P=0,95 представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности, максимальной расширенной неопределенности методики при доверительной вероятности P=0,95

Наименование антибиотика	Показатель повторяемости s_r, %	Показатель промежуточной прецизионности $s_{I(TO)}$, %	Предел повторяемости, r, %	Предел промежуточной прецизионности $r_{I(TO)}$, %	Максимальная расширенная неопределенность измерения, U, %
Левомицетин	5,2	6,0	14,6	16,8	18,4

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, 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г		ГОСТ 24104-2001
Колбы мерные	2-25-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-100-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)

Всероссийский государственный институт метрологической службы
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Одноканальные пипетки переменного объёма	1-5 $см^3$	фирма «Thermo Scientific»
	0,1-1,0 $см^3$	
	0,01- 0,10 $см^3$	
Цилиндр мерный	100 $см^3$	ГОСТ 1770-71

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 3-18K	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 «SampliQ OPT» 3$см^3$, 60 мг	фирма «Agilent Technologies»
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[illegible]ТС»
Холодильник с морозильной камерой	ООО «Атлан[illegible]»

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Система для фильтрования и дегазации элюента		фирма «Agilent Technologies»
Мембранные фильтры из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,45 мкм диаметром 47 мм		фирма «Agilent Technologies»
Колба плоскодонная	200 $см^3$	ГОСТ 25336-82
Ступка фарфоровая		ГОСТ 4197-80

3.3 Реактивы и материалы

Левомицетин, содержание основного вещества ≥99,8 %	фирма «Fluka Analytical», кат. №31667
Левомицетин-d_5, содержание основного вещества ≥ 99,8 %	фирма «Fluka Analytical», кат. № 41724
Ацетонитрил для ВЭЖХ, ≥ 99,9 %	фирма «Sigma-Aldrich», кат. № 34851
Этилацетат для ВЭЖХ, ≥ 99,5 %	фирма «Fisher Chemical», кат. № E/0906/17
Метанол для ВЭЖХ, ≥ 99,9 %	фирма «Sigma-Aldrich»; кат. № 34860
н-Гексан для ВЭЖХ, ≥ 99,9 %	фирма «Panreac»; кат. № 361347.1612
Аммоний сернокислый, х. ч.	ГОСТ 3769-78
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72

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 экстракции левомицетина этилацетатом, отгонке растворителя, растворении остатка в дистиллированной воде, 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 (ГОСТ 12.2.003)
- пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004)
- техники безопасности при работе в химической лаборатории (ППБ 1.04)
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

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 ГОСТ 15150 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 (65 ± 15) % 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 и подводкой воды.

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

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 4 М раствора сульфата аммония

В коническую колбу вместимостью 200 см^3 взвешивают (52,84±0,01) г сульфата аммония, приливают 71,3 см^3 дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения соли.

Раствор хранится в колбе с пробкой при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

Государственный институт метрологии
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

8.2.2 Приготовление смеси ацетонитрил - вода (30:70)

К 70 $см^3$ деионизованной воды приливают 30 $см^3$ ацетонитрила и тщательно перемешивают.

Смесь хранится в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре в течение 12 мес.

8.2.3 Приготовление градуировочных растворов

8.2.3.1 Приготовление основного стандартного раствора левомицетина концентрацией 100,0 мкг/$см^3$ (раствор А)

На аналитических весах взвешивают навеску стандарта левомицетина эквивалентную (0,010±0,0003) г чистого вещества и переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Добавляют 80 $см^3$ метанола, перемешивают и помещают в ультразвуковую баню на 1 минуту, затем доводят объем полученного раствор до метки метанолом и перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике при температуре (-20 ± 2)°С в течение 1 года.

8.2.3.2 Приготовление основного стандартного раствора левомицетина концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ (раствор Б)

1 $см^3$ основного стандартного раствора левомицетина массовой концентрацией 100 мкг/$см^3$ (раствор А), приготовленного по 8.2.3.1, переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем до метки метанолом и тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике при температуре (-20 ± 2)°С в течение 1 года.

8.2.3.3 Приготовление рабочего стандартного раствора левомицетина концентрацией 10,0 нг/$см^3$ (раствор В)

1 $см^3$ основного стандартного раствора левомицетина массовой концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ (раствор Б), приготовленного по 8.2.3.2, переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, доводят объем до метки метанолом и тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике при температуре (-20 ± 2)°С в течение 1 месяца.

8.2.3.4 Приготовление рабочего стандартного раствора левомицетина концентрацией 2,0 нг/$см^3$ (раствор Г)

5 $см^3$ основного стандартного раствора левомицетина массовой концентрацией 10,0 мкг/$см^3$ (раствор В), приготовленного по 8.2.3.3, переносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$, доводят объем до метки метанолом и тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике при температуре (-20 ± 2)°С в течение 1 месяца.

8.2.3.5 Приготовление основного стандартного раствора внутреннего стандарта левомицетина-d_5 концентрацией 10,0 мкг/$см^3$ (раствор Д)

1 мг внутреннего стандарта левомицетина-d_5 количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Добавляют в колбу 80 $см^3$ метанола, перемешивают и помещают в

Отдел научной технической информации и нормативной документации

ультразвуковую баню на 1 минуту, доводят объем полученного раствора до метки метанолом и перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике при температуре (-20 ± 2)°С в течение 1 года.

8.2.3.6 Приготовление основного стандартного раствора внутреннего стандарта левомицетина-d_5 концентрацией 100,0 нг/см^3 (раствор Е)

1 см^3 основного стандартного раствора внутреннего стандарта левомицетина-d5 массовой концентрацией 10,0 мкг/см^3 (раствор Д), приготовленного по 8.2.3.5, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят объем до метки метанолом и тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике при температуре (-20 ± 2)°С в течение 1 месяца.

8.2.3.7 Приготовление рабочего стандартного раствора внутреннего стандарта левомицетина-d_5 концентрацией 10,0 нг/см^3 (раствор Ж)

2,5 см^3 основного стандартного раствора внутреннего стандарта левомицетина-d5 массовой концентрацией 100,0 нг/см^3 (раствор Е), приготовленного по 8.2.3.6, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3, доводят объем до метки метанолом и тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике при температуре – 20 °С в течение 1 месяца.

8.2.3.8 Приготовление градуировочных растворов левомицетина

Готовят 2 серии градуировочных растворов левомицетина концентрацией 0,1 нг/см^3, 0,2 нг/см^3, 0,4 нг/см^3, 0,8 нг/см^3, 1,0 нг/см^3, содержащие по 1,0 нг/см^3 внутреннего стандарта левомицетина-d5 каждый. Схема приготовления представлена в таблице 2. Для этого в виалы для автосамплера вместимостью 2 см^3 последовательно приливают необходимое количество смеси ацетонитрил - вода, приготовленной по п.8.2.2 и рабочих стандартных растворов левомицетина и левомицетина-d5. Содержимое виал тщательно перемешивают.

Таблица 2 – Схема приготовления градуировочных растворов левомицетина

Концентрация левомицетина (нг/см^3)	V (смеси ацетонитрил - вода (30:70)), мкл	V (рабочего. ст-ного р-ра левомицетина), мкл	V (р-ра внутр. ст-та левомицетина–d5), мкл
0,1	850	50 (раствор Г)	100 (раствор Ж)
0,2	800	100 (раствор Г)	100 (раствор Ж)
0,4	860	40 (раствор В)	100 (раствор Ж)
0.8	820	80 (раствор В)	100 (раствор Ж)
1,0	800	100 (раствор В)	100 (раствор Ж)

Растворы готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежат.

8.3 Установление градуировочной характеристики

Полученные по п. 8.2.3.8 растворы хроматографируют, начиная с самой низкой концентрации. При этом должны соблюдаться нижеследующие условия хроматографирования и

Белорусский государственный институт технической информации и информационной документации

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 (деионизованная вода), В (ацетонитрил)
Условия подачи подвижной фазы	градиентное элюирование: 0-5 мин / В от 30% до 50%; 5-6 мин / В от 50% до 100%; 6-9 мин / В 100%; 9-9,1 мин / В от 100% до 30%; 9,1-13 мин / В 30%
Скорость подачи подвижной фазы	0,3 $см^3$/мин
Температура термостата колонки	40°С
Время удерживания левомицетина	3,2 ± 0,3 мин
Время удерживания левомицетина – d5	3,2 ± 0,3 мин

8.3.2 Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Напряжение на капилляре	4000 В
Температура газа десольвации	350 ^{0}С
Скорость потока газа десольвации	600 $дм^3$/час
Давление на небулайзере (распылителе)	45 psi

В таблице 3 представлены параметры воздействия на ионы левомицетина в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Таблица 3 – Параметры воздействия на ионы левомицетина в режиме MRM с регистрацией отрицательных ионов (-)

Аналит	Родительский ион, m/z	Дочерние ионы, m/z	Напряжение на фрагменторе, В	Энергия диссоциации, эВ
Левомицетин	321 (-)	152 / 257	120	5 / 0
Левомицетин - d_5	326 (-)	157	120	5

Количественные измерения проводятся по одному, наиболее интенсивному, дочернему иону (m/z 152), а по соотношению откликов дочерних ионов (m/z 152 к m/z 257) подтверждается достоверность определения, так как эта величина является постоянной.

8.4 Построение градуировочных графиков

Для левомицетина при помощи программного обеспечения Agilent MassHunter строят градуировочный график, устанавливая зависимость относительной площади пика (площадь пика анализируемого вещества, деленная на площадь пика внутреннего стандарта) от соответствующей относительной концентрации (концентрация анализируемого вещества, деленная на

Всероссийский научно-исследовательский институт технической информации и технико-экономической документации

концентрацию внутреннего стандарта). По полученным данным рассчитывают коэффициент регрессии b прямой $y = bx$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения

$$y = bx, \qquad (1)$$

где y- отношение площади пика левомицетина к площади пика внутреннего стандарта;

x- отношение концентрации левомицетина в градуировочном растворе к концентрации внутреннего стандарта;

b- коэффициент регрессии.

8.5 Контроль градуировочного графика

Построение градуировочного графика осуществляется каждый раз перед началом измерений. Контроль стабильности градуировочного графика 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 $K_{гр}$ = 8,3 %.

В противном случае необходимо провести построение нового градуировочного графика.

8.6 Подготовка анализируемых образцов

Отбирают не менее 1 кг средней пробы пищевого продукта или продовольственного сырья в соответствии с требованиями СТБ 1036-97 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности».

Отобранные пробы хранят в холодильнике при (-18 - +8) ^{0}С.

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

8.7 Проведение пробоподготовки для анализа на содержание левомицетина жидких, пастообразных продуктов (молоко, йогурт, сметана и т.д.) и продуктов с высоким содержанием жира (масло, спред и т.д.)

К 1,000±0,001 г жидкого или пастообразного пищевого продукта, взвешенного в полипропиленовой пробирке вместимостью 50 см^3, вносят 100 мкл внутреннего стандарта (левомицетин-d5) концентрацией 10 нг/см^3 (раствор Ж, полученный по п.8.2.3.7). В пробирку приливают 5 см^3 4 М раствора сульфата аммония, тщательно перемешивают, затем добавляют 15 см^3 этилацетата 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 этилацетатный слой и переносят его в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см^3. Этилацетатный экстракт упаривают на нагревательном модуле в токе воздуха при (50 ± 2) ^{0}С до удаления органического растворителя. К остатку приливают 5 см^3 дистиллированной воды и 5 см^3 гексана, встряхивают в течение 5 мин. Далее содержимое

Белорусский государственный институт метрологии
Отдел научной технической информации и нормативной документации

пробирок отстаивается в течение 10 мин для достижения межфазного равновесия. Гексановую фракцию отбрасывают, а полученный водный экстракт очищают методом твердофазной экстракции на картридже SampliQ (ОРТ 3 $см^3$, 60 мг). Перед нанесением экстракта картридж кондиционируют последовательно 3 $см^3$ метанола и 3 $см^3$ деионизованной воды. После пропускания экстракта картридж промывают 6 $см^3$ деионизованной воды, сушат под вакуумом в течение 10 минут. Затем экстракт элюируют 3 $см^3$ метанола. Элюат упаривают на нагревательном модуле при (45 ± 2) ^{0}С досуха. К сухому остатку приливают 1,0 $см^3$ смеси ацетонитрил - вода (30 : 70) и тщательно перемешивают на встряхивателе, затем фильтруют через мембранный шприцевой фильтр (13 мм, 0,2 мкм) из регенерированной целлюлозы в виалу. Полученный раствор используют для дальнейшего ВЭЖХ-МС анализа.

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

К 1,000±0,001 г сухого пищевого продукта, взвешенного в полипропиленовой пробирке вместимостью 50 $см^3$, вносят 100 мкл внутреннего стандарта (левомицетин-d5) концентрацией 10 нг/$см^3$(раствор Ж, полученный по п.8.2.3.7). В пробирку приливают 5 $см^3$ дистиллированной воды и интенсивно встряхивают до растворения пробы. Далее приливают 5 $см^3$ 4 М раствора сульфата аммония, тщательно перемешивают, добавляют 18 $см^3$ этилацетата 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 этилацетатный слой и переносят его в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 $см^3$. Упаривание растворителя и дальнейшая пробоподготовка осуществляется согласно п.8.7.

8.9 Проведение пробоподготовки для анализа на содержание левомицетина твердых пищевых продуктов (сыр, мясо, мясные изделия и т.д.)

К 1,000±0,001 г твердого пищевого продукта взвешенного в фарфоровой ступке вносят100 мкл внутреннего стандарта (левомицетин-d5) концентрацией 10 нг/$см^3$ (раствор Ж, полученный по п.8.2.3.7), затем содержимое ступки тщательно перетирают с 3-4 г сульфата аммония и количественно переносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$ с помощью 15 $см^3$ этилацетата. Далее в пробирку приливают 10 $см^3$ дистиллированной воды и помещают на 10 минут на электровстряхиватель для экстракции. Затем пробу центрифугируют при 10000 об/мин в течение 10 минут при температуре (5 ± 2) ^{0}С. После центрифугирования отбирают этилацетатный слой и переносят его в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 $см^3$. Упаривание растворителя и дальнейшая пробоподготовка осуществляется согласно п.8.7.

9 Выполнение измерений

Анализ полученных по п. 8.7 – 8.9 фильтратов проводят на жидкостном хроматографе с

Отдел научно-технической и нормативной документации

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 содержания левомицетина, *X*, мкг/кг, проводят по формуле:

$$X = \frac{C \times V}{m}, \qquad (2)$$

где С – концентрация левомицетина, найденная по градуировочному графику, 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 r.

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

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

где X_1 – результат первого параллельного определения;

X_2 – результат второго параллельного определения;

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

$$(\overline{X} \pm U(X)), \text{ г/кг}, \qquad (4)$$

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:

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

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

где U – относительное значение максимальной расширенной стандартной неопределенности.

Если величина $\overline{X}$ оказывается меньше предела измерения методики (CLOQ), то вычисления по формуле (2) не производят, а дают одностороннюю оценку массовой концентрации углевода в пробе в виде $X <$ (CLOQ), где (CLOQ) – нижний предел измерения методики.

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 СТБ ИСО 5725-6. 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, г/100г;

r – относительное значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 1.

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

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

(формула 7), то среднее арифметическое четырех результатов (формула 10) должно указываться как конечный заявляемый результат.

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

где $CR_{0,95} = 3,6 \times s_r$ (9)

Значения s_r представлены в таблице 1.

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

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 СТБ ИСО 5725-6.

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

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

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.

Государственный комитет по стандартизации, метрологии и сертификации Республики Беларусь
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

14 Проверка стабильности результатов измерений

Стабильность результатов измерений проверяется с использованием контрольной карты Шухарта (R-карта размахов по ИСО 8258) в соответствии с СТБ ИСО 5725-6 п.6.2.2.

При построении контрольной карты используют контрольную рабочую пробу стабильную во времени (например, пищевой продукт с внесением левомицетина, соответствующий области применения данной методики с установленным сроком годности). Содержание левомицетина в контрольной рабочей пробе должно соответствовать диапазону измерений. Контрольная рабочая проба должна храниться в условиях, обеспечивающих стабильность концентрации левомицетина 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, % (таблица 1).

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

$$s_r = \left(\frac{\sum_{1}^{L} w_i}{L} \right) / d_2 = \bar{w} / d_2 \quad , \qquad (15)$$

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, г/кг;

X_{cpi} - среднее значение результатов первого и второго определений для i-ой пары, г/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	$\bar{w}$ /

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

Белорусский государственный институт технической информации и нормативной документации

Интерпретацию результатов проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6-2002 п.6.

Методика разработана лабораторией химии пищевых продуктов ГУ «РНПЦ гигиены» 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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(обязательное)

Нормативные ссылки

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.
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.»
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.
ГОСТ 12.2.003-91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
ГОСТ ИСО 5725-6 -2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике (ISO 5725-6:1994/Соч.1:2001,IDT)

Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

Пример методики расчета неопределенности измерений

1 Описание измеряемой величины

Измерение содержания левомицетина в пищевых продуктах в концентрациях 0,2 – 1,0 мкг/кг согласно МВИ включает следующие операции:

- Отбор навески анализируемой пробы;
- Экстракцию левомицетина этилацетатом из пищевой матрицы;
- Обезжиривание пробы с помощью гексана;
- Доочистку пробы и концентрирование левомицетина с помощью твердофазной экстракции;
- Фильтрацию элюата через мембранный фильтр миллипоре;
- Хроматографирование на жидкостном хроматографе.

Математическая модель измерений выражается соотношением:

$$X = \frac{C \times V}{m \times \mathrm{Re}c} \times F_{\mathrm{Re}p} \qquad (1)$$

где С – концентрация левомицетина, найденная по градуировочному графику, нг/см^3;

m – масса навески г;

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

Rec – степень извлечения;

F_{Rep} – фактор повторяемости,

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

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

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

в) неопределенность, обусловленную смещением метода;

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

2 Оценивание относительной стандартной неопределенности (ОСН), обусловленной случайными факторами

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

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

$$u_{F_{rep}} = \frac{S_r}{\sqrt{2}} \quad (2)$$

Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Относительные стандартные неопределенности, обусловленные случайными факторами

Наименование антибиотика	Показатель повторяемости, % S_r	Относительная стандартная неопределенность, % u_{Frep}
Левомицетин	5,2	3,68

3 Оценивание относительной стандартной неопределенности, обусловленной смещением метода

При метрологической аттестации методики установлено, что максимальное значение относительной стандартной неопределенности, обусловленной смещением следующее:

Для левомицетина: $u(\overline{\mathrm{Re}c})\,\% = 0{,}72$ %.

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 представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты исследований относительной стандартной неопределенности, обусловленной построением и использованием градуировочной характеристики (ГХ) (**левомицетин**)

x_i, нг/см^3	$u_{гхi}$, %	u_{xi}, %	$u_{гх}$, %
0,100	7,7	3,5	8,4
0,200	3,9	1,7	4,3
0,400	2	0,9	2,2
0,800	1,1	0,4	1,2
1,000	1	0,3	1,1

5 Оценивание других составляющих неопределенности

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

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Значение u_n составляет:

$$u_n = \sqrt{u_{nm}^2 + u_{nV}^2}\,, \tag{3}$$

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:

$$u_{nm} = \frac{u_{весы}}{m} \times 100\,\% \tag{4}$$

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:

$$u_{весы} = \frac{0,3}{\sqrt{3}} \times \sqrt{2} = 0,2449 \tag{5}$$

$$u_{nm} = \frac{u_{весы}}{m} \times 100 = \frac{0,2449}{1000} \times 100 = 0,024495\% \tag{6}$$

Значение u_{nV} вычисляется по формуле:

$$u_{nV} = \sqrt{u_{V_0}^2 + u_{V_t}^2} \tag{7}$$

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 (70% подвижной фазы) составляет - 0.000207.

$$u_{V_0} = \frac{\Delta_V}{\sqrt{6}} = \frac{0,01}{2,45} = 0,004082 \tag{8}$$

$$u_{V_t} = \frac{0,000207 \times 5 \times 1}{\sqrt{3}} = 0,000598 \tag{9}$$

$$u_{nV} = \sqrt{0,004082^2 + 0,000598^2} = 0,00412556 \tag{10}$$

$$u_{nV(\%)} = \frac{0,00412556}{1} \times 100\% = 0,412556\% \tag{11}$$

$$u_n = \sqrt{0,024495^2 + 0,412556^2} = 0,413\% \tag{12}$$

В таблице 3 представлен бюджет неопределенности измерений, рассчитанные для проб с содержанием **левомицетина в** указанном диапазоне измеряемых концентраций.

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

Таблица 20 - Бюджет неопределенности измерений, рассчитанный для пробы с содержанием **левомицетина** в диапазоне измеряемых концентраций **0,2 -1,0 мкг/кг**

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %	
Повторяемость результатов измерений массовой концентрации **левомицетина** в пробе	А	$u_{(Frep)}$	**3,68**
Обработка пробы	В	$u_п$	**0,41**
Извлечение	А	u(Rec)	**0,72**
Построение и использование градуировочной характеристики	А	$u_{гх}$	**8,4**
Суммарная стандартная неопределенность *)		u_c	**9,2**
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**18,4**
*) Суммарная стандартная неопределенность вычисляется по формуле: $u_c = \sqrt{\sum u_i^2}$			

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

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

Примеры хроматограмм

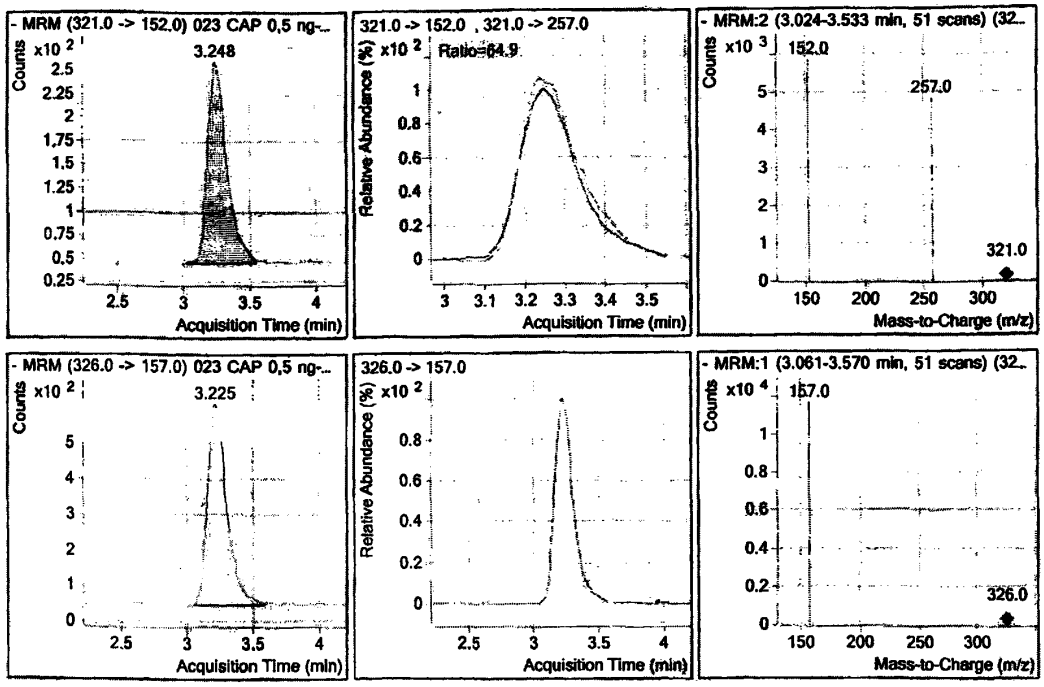

Рисунок 1 - Хроматограмма и масс-спектр стандартного раствора левомицетина концентрацией 0,5 нг/см^3 содержащего внутренний стандарт левомицетин-d5 концентрацией 1 нг/см^3

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

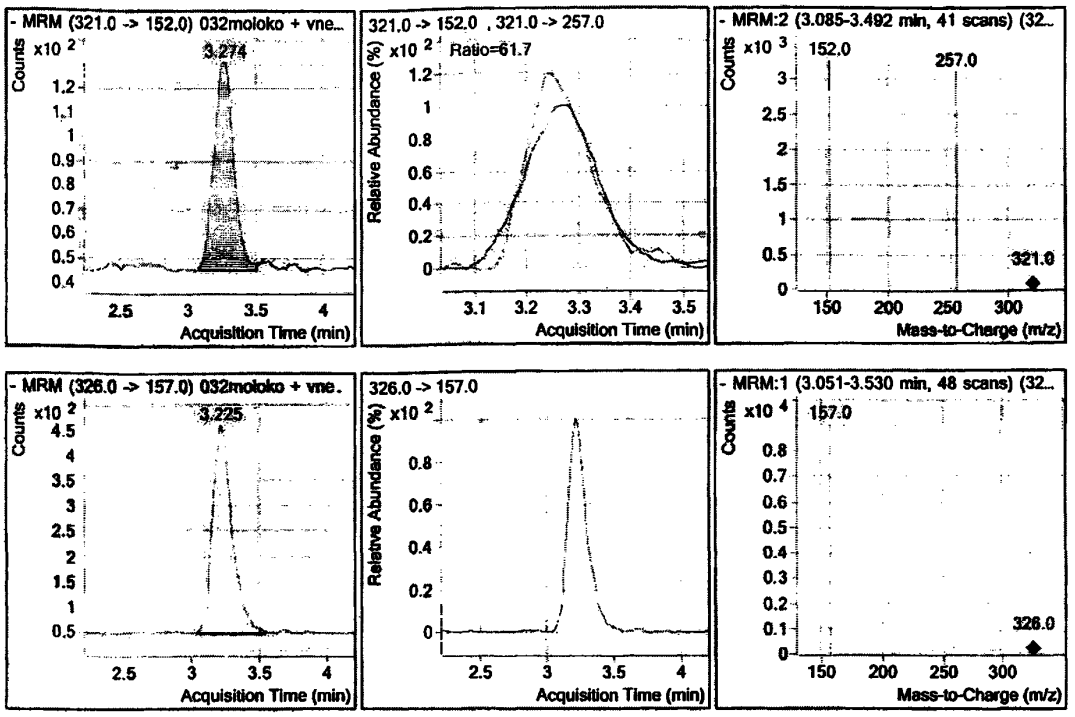

Рисунок 2 - Хроматограмма и масс-спектр, полученные при анализе пробы молока - сырья с внесенным содержанием левомицетина 0,3 мкг/кг и содержащей внутренний стандарт левомицетина-d5 концентрацией 1 нг/см^3

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

gost.e-ecolog.ru