

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ
И КОРМОВ»
ФГБУ «ВГНКИ»**



Методические указания

МУ А-1/122

УТВЕРЖДЕНО
Заместитель директора
ФГБУ «ВГНКИ»



А.В. Третьяков

_____ 20 24 г.
(на основании доверенности
от 10.07.2023 № 39/1)

Методика (метод) измерений

Методические указания по определению остаточного
содержания действующих веществ антипротозойных
препаратов в продукции животноводства методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-
спектрометрическим детектированием

Аттестована:

ФГБУ «ВГНКИ»

(наименование организации,
осуществлявшей аттестацию методики)

Регистрационный номер
в Информационном фонде по обеспечению
единства измерений

ФР. 1. 31. 2024. 48662

г. Москва
2024

СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ

РАЗРАБОТАНО

федеральным государственным бюджетным учреждением
«Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов»

(наименование инициатора разработки)

ИСПОЛНИТЕЛЬ:

федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский
государственный Центр качества и стандартизации лекарственных
средств для животных и кормов» (Отдел безопасности пищевой и
кормовой продукции)

(полное наименование организации-разработчика)

123022, г. Москва, Звенигородское ш., 5

(почтовый адрес организации-разработчика)

тел.: +7 (495) 982-50-84, +7 (499) 253-14-91;

E-mail: vgnki@fsvps.gov.ru

Руководитель организации-разработчика

Киш Леонид Карольевич

(фамилия, имя, отчество)

СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

АТТЕСТОВАНА:

федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский
государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов»

(полное наименование юридического лица, аттестовавшего методику
(метод) измерений)

Уникальный номер записи об аккредитации в реестре аккредитованных лиц юридического лица,
аттестовавшего методику (метод) измерений: РОСС RU.0001.310354

Свидетельство об аттестации методики измерений

РОСС RU.0001.310354-018/2024 от 17.05.24

(номер свидетельства и дата его
оформления)

Руководитель юридического лица,
аттестовавшего методику (метод) измерений

Киш Леонид Карольевич

(фамилия, имя, отчество)

СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

Регистрационный код методики измерений по Федеральному реестру

ФР. 1.31.2024. 48662

СВЕДЕНИЯ О ТОМ, ЧТО МЕТОДИКА (МЕТОД) ИЗМЕРЕНИЙ ВВОДИТСЯ
ВПЕРВЫЕ:

ВВЕДЕН (А) ВПЕРВЫЕ

Содержание

1. Область применения	1
2. Нормативные ссылки	2
3. Требования к показателям точности измерения	5
4. Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, материалам, реактивам	8
5. Метод измерений.....	11
6. Требования безопасности, охраны окружающей среды	11
7. Требования к квалификации операторов.....	12
8. Требования к условиям измерений	12
9. Отбор и хранение проб	12
10. Подготовка к выполнению измерений.....	13
11. Порядок выполнения измерений	26
12. Обработка результатов измерений.....	26
13. Оформление результатов измерений	33
14. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории	33
Приложение А (информационное).....	37
Приложение Б (справочное).....	38
Приложение В (справочное)	39

1. Область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и предназначен для организаций и учреждений, независимо от их организационно-правовой формы, осуществляющих контроль безопасности продукции животноводства, а также мониторинг продукции животноводства по остаточному содержанию лекарственных средств.

Методика измерений входит в состав Методических указаний по определению содержания действующих веществ антипротозойных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Диапазон измерений массовой концентрации индивидуальных антипротозойных препаратов представлен в Таблице 1.

Таблица 1 – Диапазоны измерений массовой концентрации определяемых соединений в различных матрицах

Соединение	Диапазон измерения в образцах мяса и мясной продукции, в том числе птицы, рыбы мкг/кг	Диапазон измерения в образцах субпродуктов, кишечного сырья, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах молока и молочной продукции, меда, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах яиц, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах масла, жира, мкг/кг
Пириметамин	От 0,1 до 100 включ..	От 0,1 до 100 включ.	От 0,1 до 100 включ.	От 0,1 до 100 включ.	От 10 до 10000 включ.
Диаверидин	От 0,1 до 100 включ.	От 0,1 до 100 включ.	От 0,1 до 100 включ.	От 0,1 до 100 включ.	От 0,1 до 100 включ.
Изометамидиум	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.
Бупарвакон	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ..	От 10 до 10000 включ..	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.
Имидокарб	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.

Соединение	Диапазон измерения в образцах мяса и мясной продукции, в том числе птицы, рыбы мкг/кг	Диапазон измерения в образцах субпродуктов, кишечного сырья, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах молока и молочной продукции, меда, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах яиц, мкг/кг	Диапазон измерения в образцах масла, жира, мкг/кг
Диминазен	От 10 до 10000 включ..	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.	От 10 до 10000 включ.

2. Нормативные ссылки

В настоящей методике измерений использованы ссылки на следующие документы в области стандартизации:

ГОСТ 12.1.019–2017 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

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

ГОСТ 12.0.004-2015 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

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

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.2.007.0-75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.021-75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61-75 (СТ СЭВ 5375-85) Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

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

ГОСТ 4814-57 Блоки мясные замороженные. Технические условия

ГОСТ 3117-78 Реактивы. Аммоний уксуснокислый. Технические условия

ГОСТ 5848-73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

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

ГОСТ 7269-2015 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести

ГОСТ 9792-73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 19792-2017 Мёд натуральный. Технические условия

ГОСТ 8285–91 Жиры животные топленые. Правила приемки и методы испытания

ГОСТ 26809.1-2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 26809.1-2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 2. Масло из коровьего молока, спреды,

сыры и сырные продукты, плавленые сыры и плавленые сырные продукты

ГОСТ 33791-2016 Кишки и мочевые пузыри свиные. Технические условия»

ГОСТ 33790-2016 Кишки и мочевые пузыри говяжьи. Технические условия»

ГОСТ 27752-88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28311-2021 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31720-2012 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа

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

ГОСТ 32951-2014 Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия

ГОСТ 34037-2016 Упаковка стеклянная для химических реактивов и особо чистых химических веществ. Общие технические условия

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

ГОСТ 32260-2013 Сыры полутвердые. Технические условия

ГОСТ 61-75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ Р 55064-2012 Натр едкий технический. Технические условия

ГОСТ Р ИСО 21748-2021 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений

ГОСТ Р 51447-99 Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб

ГОСТ Р 53228-2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ 31654-2012 Яйца куриные пищевые. Технические условия

ТУ 6-09-06-1092-83 Ацетонитрил ОСЧ (особо чистый)

ТУ 2635-002-05015242-2007 Диметилсульфоксид ч., х.ч

Примечание: При пользовании настоящим документом на методику измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим документом на методику измерений следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3. Требования к показателям точности измерения

Приписанные характеристики показателей точности¹ результатов измерений массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в образцах приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели точности методики (значения относительной расширенной неопределенности результатов измерений, относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости)

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности* $\pm U$, % при коэффициенте охвата $k = 2$, %	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости), σ , %	Предел повторяемости, r , % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
Масло, жир				
Пириметамин	от 10 до 10000 включ.	33	7	19
Диаверидин	от 0,1 до 1,0 включ.	37	8	22
	св. 1,0 до 100 включ.	30	7	19
Изометамидиум	от 10 до 1000 включ.	36	8	22
	св. 1000 до 10000 включ.	30	7	19

¹ В соответствии с ГОСТ Р 8.563-2009 (п. 3.4) в качестве показателя точности измерений использованы показатели неопределенности измерений.

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности* $\pm U$, % при коэффициенте охвата $k = 2$, %	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости), σ , %	Предел повторяемости, r , % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	37	10	28
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	33	9	25
Диминазен	от 10 до 10000 включ.	30	7	19
Молоко и молочные продукты, мед				
Пириметамин	от 0,1 до 1,0 включ.	33	9	25
	св. 1,0 до 100 включ.	25	7	19
Диаверидин	от 0,1 до 100 включ.	29	7	19
Изометамидиум	от 10 до 1000 включ.	27	7	19
	св. 1000 до 10000 включ.	23	7	19
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	26	6	17
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	28	7	19
Диминазен	от 10 до 100 включ.	28	6	17
	св. 100 до 10000 включ.	22	7	19
Мясо и мясные продукты, в том числе мясо птицы, рыба				
Пириметамин	от 0,1 до 10 включ.	19	7	19
	св. 10 до 100 включ.	16	7	19
Диаверидин	от 0,1 до 10 включ.	20	7	19
	св. 10 до 100 включ.	15	7	19
Изометамидиум	от 10 до 100 включ.	32	11	30

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности* $\pm U$, % при коэффициенте охвата $k = 2$, %	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости), σ , %	Предел повторяемости, r , % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
	св. 100 до 10000 включ.	15	7	19
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	25	9	25
Имидокарб	от 10 до 100 включ.	23	9	25
	св. 100 до 10000 включ.	19	8	22
Диминазен	от 10 до 100 включ.	25	9	25
	св. 100 до 10000 включ.	15	7	19
Субпродукты и кишечное сырье				
Пириметамин	от 0,1 до 100 включ.	24	7	19
Диаверидин	от 0,1 до 100 включ.	33	9	25
Изометамидиум	от 0,1 до 100 включ.	25	8	22
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	23	9	25
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	26	7	19
Диминазен	от 10 до 10000 включ.	24	9	25
Яйца и продукты их переработки				
Пириметамин	от 0,1 до 100 включ.	27	7	19
Диаверидин	от 0,1 до 100 включ.	31	7	19
Изометамидиум	от 0,1 до 100 включ.	28	8	22
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	23	9	25
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	28	7	19

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности* $\pm U$, % при коэффициенте охвата $k = 2$, %	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости), σ , %	Предел повторяемости, r , % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
Диминазен	от 10 до 1000 включ.	32	9	25
	св. 1000 до 10000 включ.	27	8	22
*-Соответствует относительному значению точности при доверительной вероятности $P=0,95$				

Значения показателя точности (расширенной неопределенности) методики используют при:

- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке деятельности лабораторий на качество проведения измерений;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики измерений в лаборатории.

4. Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, материалам, реактивам

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы.

4.1. Средства измерений, вспомогательное оборудование

4.1.1. Масс-спектрометр, оснащенный источником ионизации с электрораспылением, квадрупольными анализаторами, с диапазоном измерений от 25 до 1050 атомных единиц массы (а.е.м.), и относительным среднеквадратическим отклонением выходного сигнала по площади пика не более 10 %, с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС) (AB SCIEX, Канада, США), номер записи в Федеральном информационном фонде №58075-14.

4.1.2. Система высокоэффективной жидкостной хроматографии, состоящая из бинарного насоса со смесителем, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до $(40,0 \pm 10,0) ^\circ\text{C}$.

4.1.3. Колонка хроматографическая, заполненная обращенно-фазным сорбентом C18, длиной не более 150 мм, с диаметром частиц сорбента не более 5,0 мкм.

4.1.4. Компьютер с установленным программным обеспечением.

4.1.5. Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

4.1.6. Весы специального (I) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом (e) не более 1 мг и действительной ценой деления (d) не более 0,1 мг. (Например весы аналитические Discovery DV214C (Ohaus, Швейцария), номер записи в Федеральном информационном фонде № 33646-06).

4.1.7. Весы высокого (II) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с поверочным интервалом (e) не более 0,1 г и действительной ценой деления (d) не более 0,01 г (например: ЕК-300i (A&D Company, Япония), номер записи в Федеральном информационном фонде № 25313-06).

4.1.8. Колбы 2-10-2 и цилиндры 1-1000-2 мерные по ГОСТ 1770.

4.1.9. Дозаторы механические автоматические переменной вместимости $(2 - 20) \text{ мм}^3$, $(10 - 100) \text{ мм}^3$, $(100 - 1000) \text{ мм}^3$, $(500 - 5000) \text{ мм}^3$.

4.1.10. Бутыль стеклянная БВ-1000 по ГОСТ 34037.

4.1.11. Пробирки полипропиленовые вместимостью $15,0 \text{ см}^3$ с завинчивающимися крышками.

4.1.12. Виалы (флаконы) стеклянные вместимостью $2,0 \text{ см}^3$ с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками 9 мм.

4.1.13. Картриджи для твердофазной экстракции вместимостью не менее 3 см^3 , заполненные сорбентом на основе сополимера дивинилбензола и винилпирролидона, с частицами диаметром не более 50 мкм, массой не менее 60 мг (например, патроны для SPE Oasis HLB).

4.1.14. Модуль термостатируемый нагревательный с системой отдувки растворителей инертным газом и температурой термостатирования 40 °С.

4.1.15. Центрифуга лабораторная рефрижераторная с максимальным ускорением не менее 3000 g² и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для пробирок вместимостью 15 см³.

4.1.16. Баня ультразвуковая с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 дм³.

4.1.17. Микроцентрифуга лабораторная рефрижераторная с максимальным ускорением не менее 15000 g³ и диапазоном задаваемых температур от 4 °С до 20 °С, с адаптерами для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см³.

4.1.18. Встряхиватель для пробирок орбитального типа движения.

4.1.19. Система получения деионизированной воды высокой чистоты.

4.1.20. Холодильник с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 5 °С.

4.1.21. Камера лабораторная морозильная с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С.

4.1.22. Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 см³.

4.1.23. Ваккумное устройство для твердофазной экстракции.

4.1.24. Гомогенизатор лабораторный.

4.1.25. Шейкер лабораторный.

4.2. Реактивы, материалы

4.2.1. метанол, квалификация "х.ч.",

4.2.2. ацетонитрил, квалификация "х.ч.",

4.2.3. муравьиная кислота, квалификация "х.ч.",

4.2.4. формиат аммония, квалификация "х.ч.",

² В случае отсутствия возможности установки режима центрифугирования в единицах фактора разделения (g) следует произвести расчет скорости вращения (об/мин) для конкретной центрифуги, при указанном значении фактора разделения (g).

4.2.5. диметилсульфоксид (ДМСО) по ТУ 2635-002-05015242-2007 квалификация "х.ч.", содержание основного вещества не менее 99,5%

4.2.6. имидакарб, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.7. диминазен ацетурат, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.8. пириметамин, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.9. диаверидин, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.10. изометамидиум, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.11. бупарвакон, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.12. имидакарб-Д8, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.13. диминазен-13C2,15N4, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.14. пириметамин-Д3, доля основного вещества не менее 80%,

4.2.15. иономицин, доля основного вещества не менее 80%.

Примечание 1 – допускается применение стандартных образцов веществ с отличными содержаниями основного вещества от приведенных выше (при приготовлении точных концентраций исходных растворов стандартных образцов выполняют пересчет массы навески стандартного образца на чистое вещество по формуле 1).

Примечание 2 – допускается применение других средств измерений и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками не хуже приведенных выше.

5. Метод измерений

Измерения содержания лекарственных средств выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Детектирование анализируемых веществ проводят в режиме мониторинга выбранных реакций (*MRM*).

Используя полученные с применением метода внутреннего стандарта градуировочные характеристики, по площади пиков идентифицированных соединений находят их количественное содержание.

6. Требования безопасности, охраны окружающей среды

Используемые в работе реактивы содержат вещества, относящиеся к 1 и 2 классам опасности, при работе с ними необходимо соблюдать требования

безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

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

Операции по приготовлению и использованию градуировочных растворов аналитов и их изотопно-меченых аналогов следует проводить в вытяжном шкафу.

В связи с тем, что при работе на хромато-масс-спектрометре используются сжатые газы, следует соблюдать правила устройства и безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением по ГОСТ 12.2.085.

При выполнении измерений на хромато-масс-спектрометре следует соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.2.007.0 и инструкцией по эксплуатации прибора.

7. Требования к квалификации операторов

К операциям по подготовке проб и проведению измерений методом хромато-масс-спектрометрии допускают лиц, прошедших соответствующее обучение и освоивших настоящую методику измерений.

8. Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

температура воздуха, °C (20 ± 5) ,

атмосферное давление, мм рт.ст. $(630 - 800)$,

относительная влажность воздуха, % $(20 - 80)$.

Выполнение измерений на приборах проводят в условиях, рекомендуемых в руководстве по эксплуатации к ним.

9. Отбор и хранение проб

Отбор и хранение проб проводят, руководствуясь следующими нормативными документами: ГОСТ 4288, ГОСТ 4814, ГОСТ 7269, ГОСТ 9792, ГОСТ 31720, ГОСТ 32951, ГОСТ 19792, ГОСТ Р 51447, ГОСТ 26809.1, ГОСТ 31654, ГОСТ 33791, ГОСТ 33790, ГОСТ 32260.

10. Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы.

10.1. Приготовление растворов

10.1.1. Приготовление подвижной фазы А

В стеклянную бутылку вместимостью 1000,0 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеряют 475,0 см³ деионизированной воды, 250,0 см³ метанола (4.2.1) и 275,0 см³ ацетонитрила (4.2.2), добавляют 0,5 г формиата аммония (4.2.4) и 5,0 см³ муравьиной кислоты (4.2.3). Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.1.16) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

10.1.2 Приготовление подвижной фазы Б

В стеклянную бутылку вместимостью 1000,0 см³ мерным цилиндром (4.1.8) отмеривают 475,0 см³ метанола (4.2.1) и 525,0 см³ ацетонитрила (4.2.2), добавляют 0,5 г формиата аммония (4.2.4) и 0,5 см³ муравьиной кислоты (4.2.3). Полученный раствор дегазируют на ультразвуковой бане (4.1.16) в течение 5 мин.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре – 1 месяц.

10.1.3. Приготовление рабочих растворов

10.1.3.1 Приготовление исходных растворов стандартных образцов (C₀) аналитов с массовой концентрацией 1000 мкг/см³

На аналитических весах взвешивают 8,0-12,0 мг каждого стандартного образца и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15,0 см³. В пробирку весовым методом добавляют ДМСО, масса которого рассчитывается по формуле (1):

$$m_p = \frac{m \cdot M_a \cdot P_a \cdot \rho}{M_c \cdot 100 \cdot C} \quad (1)$$

где m_p —масса метанола, г;

m —масса стандартного образца, г;

M_a — молярная масса чистого вещества, г/моль;

M_c —молярная масса соли, г/моль;

P_a — степень чистоты стандартного образца, %;

ρ – плотность ДМСО, г/см³;

C – концентрация раствора C_0 , г/см³;

Плотность ДМСО (ρ) указывают в зависимости от температуры воздуха в помещении в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – плотность ДМСО в зависимости от температуры

Температура воздуха, °C	Плотность ДМСО (ρ), г/см ³
15,0	1,1041
16,0	1,1033
17,0	1,1025
18,0	1,1017
19,0	1,1009
20,0	1,1001
21,0	1,0993
22,0	1,0985
23,0	1,0977
24,0	1,0969
25,0	1,0961

При использовании стандартных образцов с точной заявленной массой, разведение исходного раствора производят непосредственно в таре производителя. Количество растворителя, необходимое для разведения рассчитывают по формуле 1. После растворения жидкий слой переносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³.

Приготовленные растворы хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 1 года.

Перед использованием растворы выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.2. Приготовление раствора (C_1)

Дозатором переменного объема отбирают по 1,0 см³ растворов C_0 изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и по 0,01 см³ приметамина и диаверидина в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 100 мкг/мл для изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 1 мкг/мл для приметамина и диаверидина.

Приготовленные растворы хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 6 месяцев.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.3. Приготовление раствора (C₂)

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C₁ в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °C в течение 3 месяцев.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.4. Приготовление раствора (C₃)

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора C₂ в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °C в течение 1 недели.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.5. Приготовление раствора (P₁)

Дозатором переменного объема отбирают по 1,0 см³ растворов C₀ изометамидиума, имиδοкарба, диминазена, бупарвакона, пириметамина и 0,01 см³ диаверидина в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 100 мкг/см³ для изометамидиума, имиδοкарба, диминазена, бупарвакона, пириметамина и 1 мкг/см³ для диаверидина.

Приготовленные растворы хранят в морозильной камере при температуре минус 20°C в течение 6 месяцев.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.6. Приготовление раствора (P₂)

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора P₁ в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 3 месяцев.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.7. Приготовление раствора (P₃)

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора P₂ в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 1 недели.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.8. Приготовление исходных растворов (D₀) внутренних стандартов (имидокарб-Д8, диминазен-13C₂,15N₄, пириметамин-Д3, иономицин)

На аналитических весах взвешивают 8,0-12,0 мг внутренних стандартов аналитов и переносят в отдельные полипропиленовые пробирки вместимостью 15,0 см³. В пробирки весовым методом добавляют растворитель - метанол, масса которого рассчитывается по формуле (1).

Приготовленные растворы хранят в морозильной камере при температуре минус 20 °С в течение 1 года.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.9. Приготовление раствора внутренних стандартов (D_1)

Дозатором переменного объема отбирают по 0,1 см³ растворов D_0 имидакарба-Д8, пириметамин-ДЗ, иономицина и 1 см³ диминазена-13C2,15N4 в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 10 мкг/см³ для имидакарба-Д8, пириметамин-ДЗ, иономицина и 100 мкг/см³ для диминазена-13C2,15N4.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 6 месяцев.

Перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут.

10.1.3.10. Приготовление раствора внутренних стандартов (D_2)

Дозатором переменного объема отбирают 1,0 см³ раствора D_1 в мерную пробирку вместимостью 10,0 см³, доводят до метки метанолом и перемешивают.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 1 мкг/мл для имидакарба-Д8, пириметамин-ДЗ, иономицина и 10 мкг/см³ для диминазена-13C2,15N4.

Приготовленный раствор хранят при температуре минус 20 °С в течение 3 месяцев.

10.1.4. Приготовление градуировочных растворов ($G_1 - G_5$) и ($F_1 - F_5$)

10.1.4.1 Приготовление образцов продукции животноводства, за исключением образцов жира и масла (G_5)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D_2 (10.1.3.10) и 0,1 см³ раствора C_1 (10.1.3.2), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 10000 нг/см³ для изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 100 нг/см³ для пириметамин и диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.2. Приготовление образцов продукции животноводства, за исключением образцов жира и масла (G4)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,1 см³ раствора C₂ (10.1.3.3), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 10.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 1000 нг/см³ для изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 10 нг/см³ для пириметамин и диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.3. Приготовление образцов продукции животноводства, за исключением образцов жира и масла (G3)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,1 см³ раствора C₃ (10.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 100 нг/см³ для изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 1 нг/см³ для пириметамин и диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.4. Приготовление образцов продукции животноводства, за исключением образцов жира и масла (G2)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,05 см³ раствора C₃ (10.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 50 нг/см³ для изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 0,5 нг/см³ для пириметамина и диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.5. Приготовление образцов продукции животноводства, за исключением образцов жира и масла (G1)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,01 см³ раствора C₃ (10.1.3.4), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 10 нг/см³ для изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 0,1 нг/см³ для пириметамина и диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.6. Приготовление образцов жира и масла (F5)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,1 см³ раствора P₁ (10.1.3.5), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 10000 нг/см³ для пириметамин, изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 100 нг/см³ для диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.7. Приготовление образцов жира и масла (F4)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,1 см³ раствора P₂ (10.1.3.6), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 1000 нг/см³ для пириметамин, изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 10 нг/см³ для диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.8. Приготовление образцов жира и масла (F3)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,1 см³ раствора P₃ (10.1.3.7), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 100 нг/см³ для пириметамин, изометамидиума, имидокарба, диминазена, бупарвакона и 1 нг/см³ для диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.9. Приготовление образцов жира и масла (F2)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу

добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,05 см³ раствора C₂ (9.1.3.7), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 50 нг/см³ для пириметамин, изометамидиума, имидакарба, диминазена, бупарвакона и 0,5 нг/см³ для диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.4.10. Приготовление образцов жира и масла (F1)

В пластиковый флакон вместимостью 15,0 см³ помещают 1,0 г образца, не содержащего искомым аналитов (бланк). С помощью дозатора к образцу добавляют 0,05 см³ раствора D₂ (10.1.3.10) и 0,01 см³ раствора P₃ (10.1.3.7), встряхивают на шейкере-вортексе 1 минуту. Далее проводят пробоподготовку согласно п. 9.4.1.

Массовая концентрация аналитов в растворе составляет 10 нг/см³ для пириметамин, изометамидиума, имидакарба, диминазена, бупарвакона и 0,1 нг/см³ для диаверидина.

Приготовленный образец хранят в холодильнике при температуре 4°C в течение суток.

10.1.5. Приготовление вспомогательных растворов

10.1.5.1. Приготовление 0,5% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле

В мерную колбу вместимостью 100 см³ мерным цилиндром отмеряют 80 см³ ацетонитрила, вносят 0,5 см³ муравьиной кислоты, доводят ацетонитрилом до метки, перемешивают.

Раствор годен к использованию в течение 1 месяца.

10.1.5.2. Приготовление 20% раствора метанола в воде

В мерную колбу вместимостью 100,0 см³ мерным цилиндром отмеряют 50 см³ воды, вносят 20,0 см³ метанола, доводят водой до метки, перемешивают.

10.2. Подготовка прибора к измерениям

Подготовку хромато-масс-спектрометра к работе осуществляют в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора.

10.2.1. Параметры настройки жидкостного хроматографа

температура колонки 40 °С;

скорость потока подвижной фазы 0,3 см³/мин.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования: в начальный момент и до 2,0 мин элюирование в 100%-ной мобильной фазе А, с 2,0 по 2,1 мин градиентное элюирование к 100%-ной мобильной фазе Б, с 2,1 по 9,0 мин элюирование в 100%-ной мобильной фазе Б, с 9,0 по 9,10 мин переход к элюированию в 100%-ной мобильной фазе А, с 9,1 по 17,0 мин уравнивание колонки в 100%-ной мобильной фазе А.

10.2.2. Параметры настройки масс-спектрометрического детектора

Таблица 4 – Параметры в режиме MRM в условиях электрораспыления

№	Определяемое вещество	Ион-предшественник, m/z	Дочерние ионы, m/z	Потенциал декластеризации, В	Энергия столкновений, эВ / Потенциал на выходе из ячейки, В
1	Имидокарб	349,4	188,2	210	36/15
			162,2	210	28/11
2	Диминазен	282,4	119,2	130	21/15
			135,2	130	19/15
3	Пириметамин	249,1	177,1	100	40/9
			233,0	100	35/9
4	Диаверидин	261,0	245,2	100	33/10
			123,1	100	27/9
5	Изометамидиум	460,3	298,2	130	30/11
			313,2	130	26/15
6	Бупарвакон	325,2	186,2	-130	-41/-16
			297,1	-130	-40/-15
7	Имидокарб-Д8	357,2	192,2	150	45/15
8	Диминазен- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₄	288,2	138,2	132	19/10
9	Пириметамин-Д3	254,2	179,3	100	40/9
10	Иономицин	732,5	279,1	10	38

Напряжение на зонде (IS):

+ 5500 В для положительного режима регистрации ионов;

- 4500 В для отрицательного режима регистрации ионов;

Разрешение квадруполей Q1/Q3: единичное;

Поток газа для фрагментации (CAD): 6.

10.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику строят заново перед каждой новой серией измерений. Для нахождения градуировочной характеристики используют не менее четырех градуировочных растворов.

Процедура приготовления градуировочных растворов описана в разделе 10.1.4. Для приготовления проводят обработку "чистых" проб (бланков) согласно разделу 10.4, не содержащих действующих веществ, к которым перед обработкой добавляют раствор внутренних стандартов и рабочие растворы аналитов в количестве, необходимом для получения массовых концентраций в соответствующих пределах для каждого определяемого вещества (10.1.4).

Внутренние стандарты используют согласно Таблице 5.

Таблица 5 – Аналиты и соответствующие им внутренние стандарты, используемые для построения градуировочного графика

Аналит	Внутренний стандарт
Имидокарб	Имидокарб-Д8
Диминазен	Диминазен-13C2,15N4
Пириметамин	Пириметамин-Д3
Диаверидин	Пириметамин-Д3
Изометамидиум	Имидокарб-Д8
Бупарвакон	Иономицин

Градуировочную зависимость строят с помощью программного обеспечения масс-спектрометра в координатах «отношение площади пика определяемого вещества к площади пика внутреннего стандарта этого вещества» – «концентрация определяемого вещества в градуировочном растворе к концентрации внутреннего стандарта».

При построении градуировочной зависимости используют линейную регрессию, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

Для нахождения градуировочной характеристики анализируют градуировочные растворы. Подвижную фазу, реагенты и матрицу предварительно проверяют на наличие исследуемых аналитов или других соединений, мешающих определению.

10.4. Подготовка проб

10.4.1. Подготовка проб мяса, мясных продуктов, рыбы, субпродуктов, яиц и яичных продуктов, кишок и кишечного сырья, молока и молочных продуктов, сыра

Образец предварительно очищают от грубой соединительной ткани. 100 г пробы измельчают на гомогенизаторе (4.1.25) и взвешивают в полипропиленовой пробирке (4.1.11) ($1,00 \pm 0,01$) г образца (Восстановление сухого меланжа, белка или желтка проводят по ГОСТ 31720 (по 5.4.3). Сухие молочные продукты восстанавливают по ГОСТ 29245 (по 3.4). Концентрированное молоко разводят дистиллированной водой по ГОСТ 29245 (по 3.3)). Дозатором в пробирку вносят $0,05 \text{ см}^3$ раствора внутренних стандартов D_2 (10.1.3.10). Осторожно приливают 3 см^3 раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (10.1.5.1) и помещают пробирку на 15 мин во встряхиватель (4.1.18) для экстракции. Затем центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин при температуре 4°C . Переливают жидкий слой в новую полипропиленовую пробирку, помещают ее на нагревательный модуль (4.1.14) и упаривают в токе азота при температуре 40°C до $0,1\text{--}0,2 \text{ см}^3$. К остатку приливают $2,0 \text{ см}^3$ деионизированной воды, перемешивают в шейкере (4.1.25) 5 с и центрифугируют при 3000 g в течение 10 мин при температуре 4°C . Полученный экстракт очищают методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Перед нанесением экстракта на картридж (4.1.13) последовательно кондиционируют сорбент $2,0 \text{ см}^3$ ацетонитрила и $2,0 \text{ см}^3$ деионизированной воды. Затем пропускают через картридж экстракт (при процедуре очищения вакуум или избыточное давление не применяют). Промывают картридж $2,0 \text{ см}^3$ раствора метанола в воде (10.1.5.2), сушат в вакууме водоструйного насоса в течение 10 мин и элюируют аналиты $2,0 \text{ см}^3$ раствора муравьиной кислоты в

ацетонитриле (10.1.5.1) в новую полипропиленовую пробирку. Элюат помещают на нагревательный модуль и упаривают в токе азота при температуре 40 °С до 0,2 - 0,3 см³. К полученному остатку приливают 0,5 см³ раствора мобильной фазы А (10.1.1) и тщательно перемешивают, переливают экстракт в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 см³, доводят объем фазой А до 1 см³ и центрифугируют при 15000 g в течение 10 мин при температуре 4 °С. Пипеточным дозатором переносят центрифугат в вialу для автосамплера жидкостного хроматографа. Полученный раствор используют для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

10.4.2. Подготовка проб меда

Отобранную пробу меда перед анализом тщательно перемешивают и взвешивают ($1,00 \pm 0,01$) г в полипропиленовой пробирке. Добавляют в пробирку 2 см³ деионизованной воды и перемешивают до полного растворения меда (разрешается применять нагревание на водяной бане до 40 °С). Пипеточным дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₂. Далее очистку образца проводят методом ТФЭ по 10.4.1.

10.4.3 Подготовка проб животного жира, масла из коровьего молока и продуктов с высоким содержанием молочного жира

100 г образца тщательно гомогенизируют и взвешивают в полипропиленовой пробирке ($1,00 + 0,01$) г образца. Дозатором в пробирку вносят 0,05 см³ раствора внутренних стандартов D₂ (10.1.3.10). Осторожно приливают 3 см³ раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле и помещают пробирку на 15 мин в ультразвуковую баню при 40 °С, а затем на встряхиватель на 5 мин для экстракции. Затем центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин при температуре 4 °С. Жидкий слой переносят в новую пробирку и убирают в морозилку (4.1.21) на 2 часа.

После заморозки пробирки центрифугируют 5 минут при 3000 g и температуре 4 °С, переносят жидкий слой в новую пробирку и упаривают в токе азота при температуре 40 °С до 0,1-0,2 см³. К остатку приливают 2,0 см³ деионизированной воды, перемешивают в шейкере 5 с и центрифугируют

при 3000 г в течение 10 мин при температуре 4 °С. Далее очистку образца проводят методом ТФЭ по 10.4.1.

11. Порядок выполнения измерений

При выполнении измерений в инжектор хроматографа вводят анализируемый раствор, полученный в п. 10.4. Подвижную фазу и реагенты предварительно проверяют на наличие целевых аналитов или других соединений, мешающих определению. С помощью установленных градуировочных характеристик проводят количественное определение аналитов в анализируемом растворе.

12. Обработка результатов измерений

12.1. Результаты измерений обрабатываются с помощью программного обеспечения масс-спектрометра и выдаются в виде массовой концентрации анализируемого вещества в нг/см³.

Массовую концентрацию аналита в пробе, мкг/кг вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V_{\text{пр}}}{m}, \quad (2)$$

где C – массовая концентрация вещества, полученная по градуировочному графику (нг/см³),

m – масса навески пробы (г),

$V_{\text{пр}}$ – конечный объем раствора после подготовки пробы к анализу (см³).

В случае необходимости содержание аналита в пробе сухого или концентрированного молока, сухих яичных продуктов (меланжа, белка или желтка), X (мкг/кг), рассчитывают по формуле

$$X = K \cdot \frac{C \cdot V_{\text{пр}}}{m}, \quad (3)$$

где C – массовая концентрация аналита, полученная по градуировочному графику, нг/см³;

$V_{\text{пр}}$ – конечный объем раствора после подготовки пробы, см³;

m – масса навески пробы, г;

K – коэффициент, учитывающий восстановление сухих молочных и сухих яичных продуктов (меланжа, белка или желтка), разведение концентрированного молока

$$K = \frac{m_{\text{восст}}}{m_{\text{сух(конц)}}}, \quad (4)$$

где $m_{\text{восст}}$ – масса восстановленного продукта, г;

$m_{\text{сух(конц)}}$ – масса сухого (концентрированного) продукта, взятого для восстановления, г.

12.2. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (5):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r, \quad (5)$$

где X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой концентрации вещества, мкг/кг,

r – значение предела повторяемости, % (таблица 2).

Полученные среднеарифметические значения двух результатов параллельных измерений анализируемой пробы округляют:

- в диапазоне значений от 0,1 до 1 мкг/кг включительно – до второго десятичного знака после запятой;
- в диапазоне значений от 1 до 100 мкг/кг включительно – первого десятичного знака после запятой;
- в диапазоне значений от 100 до 10000 мкг/кг включительно – до целого числа.

12.3 Если условие (5) не выполняется, проводят еще одно исследование, в котором получают 4 результата в полном соответствии с данной методикой измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие:

$$\frac{4 \cdot |X_{\max} - X_{\min}| \cdot 100}{(X_1 + X_2 + X_3 + X_4)} \leq CR_{0,95}, \quad (6)$$

где $X_{\max}$, $X_{\min}$ – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой доли аналита, мкг/кг;

$CR_{0,95}$ – значение критического диапазона для уровня вероятности $P = 0,95$ и n – результатов определений.

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r,$$

для $n = 4$

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r, \quad (7)$$

где σ_r – показатель повторяемости, % (таблица 6).

12.4 Если условие (6) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

12.5 В случае если результат анализа превышает верхний предел диапазона измерения, то выдают результат в следующей формулировке: «Содержание аналита превышает верхний предел диапазона измерения методики».

Таблица 6 - Относительные значения показателя внутрилабораторной прецизионности и пределов внутрилабораторной прецизионности и воспроизводимости при доверительной вероятности $P=0,95$

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), σ_{R_i} , %	Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), R_L , %	Предел воспроизводимости (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя лабораториями), R_L , %
Масло, жир				
Пириметамин	от 10 до 10000 включ.	15	42	49
Диаверидин	от 0,1 до 1,0 включ.	18	50	59
	св. 1,0 до 100 включ.	15	42	49
Изометамиды	от 10 до 1000 включ.	18	50	59
	св. 1000 до 10000 включ.	15	42	49
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	18	50	59
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	15	42	49
Диминазен	от 10 до 10000 включ.	14	50	59
Молоко и молочные продукты, мед				
Пириметамин	от 0,1 до 1,0 включ.	15	42	49
	св. 1,0 до 100 включ.	12	33	40

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), σ_{R_i} , %	Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), R_L , %	Предел воспроизводимости (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя лабораториями), R_L , %
Диаверидин	от 0,1 до 100 включ.	14	39	46
Изометамидум	от 10 до 1000 включ.	13	36	43
	св. 1000 до 10000 включ.	11	30	36
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	13	36	43
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	12	33	40
Диминазен	от 10 до 100 включ.	14	39	46
	св. 100 до 10000 включ.	10	28	33
Мясо и мясные продукты, в том числе мясо птицы, рыба				
Пириметамин	от 0,1 до 10 включ.	9	25	30
	св. 10 до 100 включ.	7	19	16
Диаверидин	от 0,1 до 10 включ.	9	25	30
	св. 10 до 100 включ.	7	19	20

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), σ_{R_i} , %	Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), R_L , %	Предел воспроизводимости (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя лабораториями), R_L , %
Изометамидум	от 10 до 100 включ.	15	42	49
	св. 100 до 10000 включ.	7	19	23
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	12	33	40
Имидокарб	от 10 до 100 включ.	11	30	36
	св. 100 до 10000 включ.	9	25	30
Диминазен	от 10 до 100 включ.	12	33	40
	св. 100 до 10000 включ.	7	19	23
Субпродукты и кишечное сырье				
Пириметамин	от 0,1 до 100 включ.	11	30	36
Диаверидин	от 0,1 до 100 включ.	14	39	46
Изометамидум	от 0,1 до 100 включ.	12	33	40
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	11	30	36

Определяемый показатель	Диапазон измерения, мкг/кг	Показатель внутрилабораторной прецизионности (относительное среднеквадратическое отклонение внутрилабораторной прецизионности), σ_{R_i} , %	Предел внутрилабораторной прецизионности (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя результатами анализа, полученными в условиях внутрилабораторной прецизионности), R_L , %	Предел воспроизводимости (допускаемое для принятой вероятности $P=0,95$ расхождение между двумя лабораториями), R_L , %
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	12	33	40
Диминазен	от 10 до 10000 включ.	11	30	36
Яйца и продукты их переработки				
Пириметамин	от 0,1 до 100 включ.	13	36	43
Диаверидин	от 0,1 до 100 включ.	15	42	49
Изометамидиум	от 0,1 до 100 включ.	13	36	43
Бупарвакон	от 10 до 10000 включ.	11	30	36
Имидокарб	от 10 до 10000 включ.	13	36	43
Диминазен	от 10 до 1000 включ.	15	42	49
	св. 1000 до 10000 включ.	13	36	43

13. Оформление результатов измерений

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

$$\bar{X}_{k,c} \pm 0,01 \cdot U_p \cdot \bar{X}_{k,c}, \text{ либо } \bar{X}_{k,c} \pm 0,01 \cdot \delta_{\text{л}} \cdot \bar{X}_{k,c} \text{ при } P=0,95,$$

где $\bar{X}_{k,c}$ – среднее арифметическое значение результатов n определений массовой концентрации аналита, признанных приемлемыми по 11.1, 11.2, мкг/кг;

U_p – значение относительной расширенной неопределенности, % (таблица 2);

$\delta_{\text{л}}$ – относительное значение показателя точности методики, которое приведено в таблице 2.

14. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Оценку прецизионности результатов испытаний в условиях повторяемости и воспроизводимости проводят в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-1, ГОСТ ИСО 5725-2.

Периодичность получения результатов контрольных процедур и формы их регистрации приводят в документах лаборатории, устанавливающих порядок и содержание работ по организации методов контроля стабильности результатов измерений в пределах лаборатории.

14.1. Оперативный контроль процедуры измерений

Оперативный контроль процедуры измерений проводит исполнитель измерений с целью проверки готовности лаборатории к проведению измерений рабочих проб или оперативной оценки качества результатов измерений, полученных совместно с результатом контрольного измерения. Оперативный контроль проводят в следующих случаях:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, которые могут повлиять на стабильность результатов измерений (смена реактивов, использование средств измерений после ремонта и т.д.);

– при получении двух из трёх последовательных результатов измерений рабочих проб в виде медианы.

Оперативный контроль процедуры измерений проводит непосредственно исполнитель измерений на основе оценки отдельно взятой контрольной процедуры (K_k) и сравнения результата процедуры с нормативом контроля (K).

Оперативный контроль процедуры измерений проводят по следующей схеме:

- проведение контрольного измерения и получение результата контрольной процедуры;
- расчёт результата контрольной процедуры (K_k);
- расчет норматива контроля (K).

Реализация решающего правила контроля – сопоставление результата контрольной процедуры с нормативом контроля и выводы по результатам контроля.

Оперативный контроль процедуры измерений может быть проведён с применением метода добавок (по 14.2).

Применение метода добавок используют при наличии условий для создания проб с введенными добавками, адекватных анализируемым пробам и при отсутствии образцов для контроля.

При организации контроля исполнитель анализа в соответствии с выбранным алгоритмом проведения контрольной процедуры анализа выбирает (при необходимости готовит) средства контроля.

Результаты контрольных измерений, полученные при оперативном контроле процедуры анализа, проводимом с каждой серией рабочих проб, могут быть использованы при реализации любой из форм контроля стабильности результатов анализа.

14.2 Оперативный контроль процедуры измерений с применением метода добавок

Средствами контроля являются:

- пробы, исследуемые по методике (рабочие пробы);
- пробы продукции, исследуемые по методике с известной добавкой аналитов (рабочие пробы с добавкой).

Рабочие пробы для проведения оперативного контроля выбирают таким образом, чтобы массовая концентрация действующих веществ антипротозойных препаратов в пробе с добавкой не превышала верхней границы диапазона измерений. Анализируемую пробу делят на 2 равные части. Одну часть оставляют без изменения, во вторую делают добавку действующего вещества антипротозойного препарата C_{∂} , в зависимости от показателя внутрилабораторной прецизионности согласно Приложению В.

В соответствии с данной методикой в условиях повторяемости получают результаты контрольных измерений массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в рабочей пробе – X_n и в рабочей пробе с внесённой известной добавкой аналитов – $X_{n+\partial}$.

Результат контрольной процедуры K_k рассчитывают по формуле:

$$K_k = X_{n+\partial} - X_n - C_{\partial}, \text{ мкг/кг.} \quad (8)$$

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta_{\text{Л } X_{n+\partial}}^2 + \Delta_{\text{Л } X_n}^2}, \text{ мкг/кг,} \quad (9)$$

где $\pm \Delta_{\text{Л } X_{n+\partial}}$ – характеристика погрешности результатов контрольного измерения, соответствующая массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в пробе с добавкой, рассчитанная по формуле:

$$\Delta_{\text{Л } X_{n+\partial}} = 0,01 \delta_{\text{Л}} X_{n+\partial}, \text{ мкг/кг,} \quad (10)$$

$\pm \Delta_{\text{Л } X_n}$ – характеристика погрешности результатов контрольного измерения, соответствующая массовой концентрации действующих веществ антипротозойных препаратов в пробе, рассчитанная по формуле:

$$\Delta_{\text{Л } X_n} = 0,01 \delta_{\text{Л}} X_n, \text{ мкг/кг,} \quad (11)$$

$\pm \delta_{\text{Л}}$ – относительное значение характеристики погрешности результатов измерений.

Реализация решающего правила контроля.

$$|K_k| \leq K \quad (12)$$

При невыполнении этого условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (12) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительному результату, и принимают меры к их устранению.

Примечание – Если в рабочей пробе установлено отсутствие аналитов на уровне нижней границы диапазона измерений, установленного методикой измерений, то эта рабочая проба с введённой добавкой действующего вещества антипротозойных препаратов C_o может служить образцом для контроля с аттестованным значением C_o . В этом случае результат контрольной процедуры K_k рассчитывают по формуле:

$$K_k = X - C_o, \text{ мкг/кг}, \quad (13)$$

где X – результат контрольного измерения массовой доли действующих веществ антипротозойных препаратов в образце для контроля;

C_o – массовая концентрация введенной добавки, мкг/кг.

Норматив контроля рассчитывают по формуле:

$$K = 0,01\delta_{\text{Л}}C_{\text{Д}} \text{ мкг/кг} \quad (14)$$

Приложение А
(информационное)

Библиография

[1] РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

[2] Р 50.2.003-2000 ГСИ «Внутренний оперативный контроль качества. Пакет программ Qcontrol».

Приложение Б

(справочное)

Пример хроматограммы имидакарба и его внутреннего стандарта имидакарба-Д8, полученной в ходе валидационного эксперимента, представлен на рисунке 1.

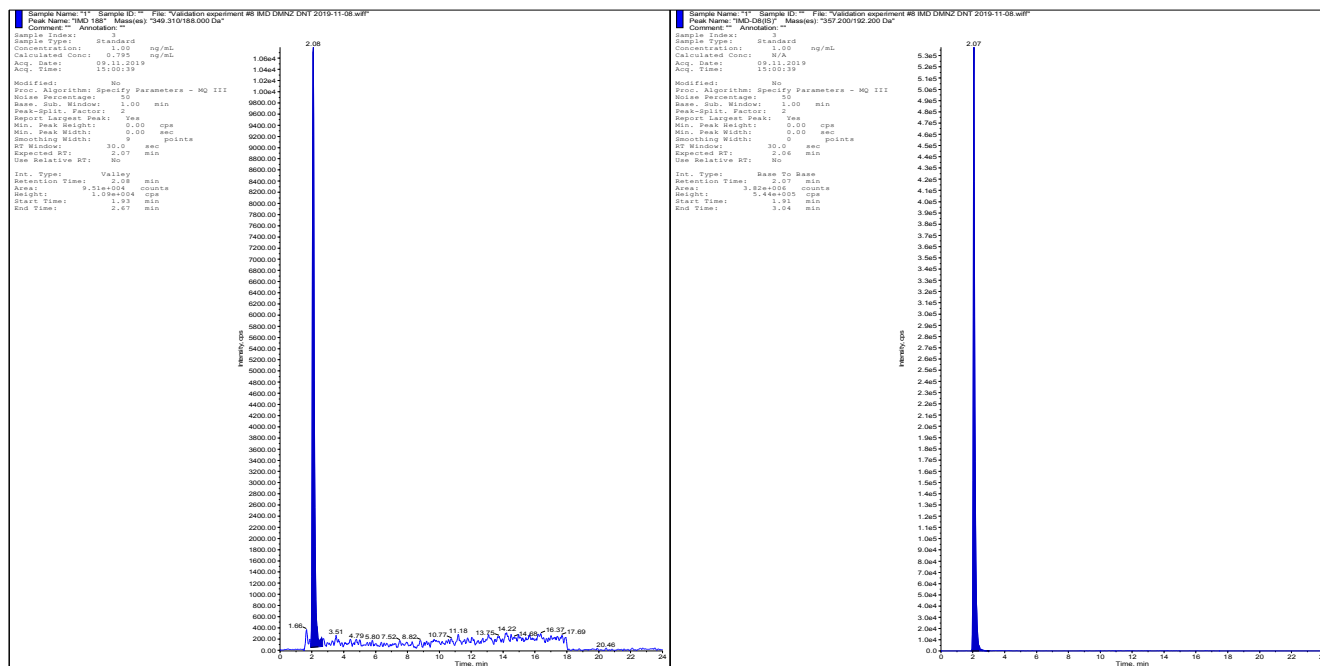


Рисунок 1. Хроматограмма имидакарба и имидакарба-Д8 с концентрацией в растворе 10 нг/см³ и 50 нг/см³ соответственно

Приложение В

(справочное)

Добавка к пробе (разбавленной пробе) и коэффициент разбавления в зависимости от показателя внутрилабораторной прецизионности

Таблица В.1 – Значения величины добавки к пробе (разбавленной пробе) и коэффициента разбавления в зависимости от показателя внутрилабораторной прецизионности

Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{\text{РЛ}}$, % содержания компонента в пробе	Значение величины добавки ω , % содержания компонента в пробе, не менее	Коэффициент разбавления пробы η , не менее
12	63	1,6
13	70	1,7
14	78	1,8
15	86	1,9
16	94	1,9
17	100	2,0
18	110	2,1
19	120	2,2
20	130	2,3
21	140	2,4
22	160	2,6
23	170	2,7

МУ А-1/122

(обозначение документа,
регламентирующего методику измерений)

Ключевые слова:

Антипротозойные препараты, продукция животного происхождения,
лекарственные средства, пириметамин, диаверидин, изометамидиум,
бупарвакон, имидакарб, диминазен

Руководитель разработки:

Заместитель директора
ФГБУ «ВГНКИ»
(должность)

(личная подпись)

А.В. Третьяков
(инициалы, фамилия)

Исполнители:

Старший научный
сотрудник отдела
безопасности пищевой
и кормовой продукции
(должность)

(личная подпись)

И.В. Батов
(инициалы, фамилия)

