МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34957— 2023

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Иммуноферментный метод определения остаточного содержания тилозина

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом МТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 31 мая 2023 г. № 162-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 июня 2023 г. № 470-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34957—2023 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 15 марта 2024 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

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

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Сущность метода 2
5 Требования безопасности и условия выполнения измерений 3
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы 3
7 Подготовка к проведению иммуноферментного анализа 4
8 Проведение иммуноферментного анализа 6
9 Обработка результатов измерения 7
10 Метрологические характеристики 9
11 Контроль неопределенности результатов измерения 9
12 Контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости с применением карт Шухарта 9
Приложение А (обязательное) Тест-система «Тилозин — ИФА» 11
Приложение Б (рекомендуемое) Схема заполнения лунок планшета 12

Поправка к ГОСТ 34957—2023 Продукты пищевые. Иммуноферментный метод определения остаточного содержания тилозина

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения

(ИУС № 3 2024 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Иммуноферментный метод определения остаточного содержания тилозина

Food products. Immunoenzyme method of determination of tylosin residues

Дата введения — 2024—03—15

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на яйца, молоко, молочные продукты (сливки, сметана), мед и устанавливает иммуноферментный метод определения остаточного содержания тилозина в диапазоне измерений от 0,5 до 100 мкг/кг — для молока и от 1 до 200 мкг/кг — для молочных продуктов, яиц и меда.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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

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

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

ГОСТ 334 Бумага масштабно-координатная. Технические условия

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

ГОСТ 2652 Калия бихромат технический. Технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 6709* Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 10873 Аммоний сернокислый (сульфат аммония) очищенный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 19792—2017 Мед натуральный. Технические условия

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

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 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31654 Яйца куриные пищевые. Технические условия

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018.

Издание официальное

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

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **тест-система:** Набор (комплект) специально подобранных реагентов (реактивов) и составных частей, предназначенный для определения одного или нескольких конкретных веществ.

3.1.2 **рабочий раствор:** Раствор одного или нескольких реактивов, приготовленный непосредственно перед использованием и необходимый для выполнения процедуры анализа.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

АГ	—	антиген;
АТ	—	антитела;
БСА	—	бычий сывороточный альбумин;
ИФА	—	иммуноферментный анализ;
ОП	—	оптическая плотность;
ОТ	—	буфер для отмывки;
РС	—	рабочий раствор субстрата;
ФК	—	ферментный конъюгат;
ФСБТ	—	фосфатно-солевой буферный раствор с 0,05 %-ным Твин-20;
ФСБТ-БСА	—	фосфатно-солевой буферный раствор с 0,05 %-ным Твин-20 и 1 %-ным бычьим сывороточным альбумином.

4 Сущность метода

4.1 Иммуноферментный метод основан на измерении массовой доли тилозина в растворах экстрактов исследуемых проб с помощью непрямого твердофазного конкурентного ИФА.

4.2 Непрямой твердофазный конкурентный ИФА основан на способности тилозина взаимодействовать со специфичными АТ в условиях конкуренции с белковым конъюгатом антибиотика, нанесенным на поверхность лунок планшета, — твердофазным АГ.

4.3 Связавшиеся с твердой фазой АТ выявляют путем измерения интенсивности окрашивания конечного продукта реакции: вторичных антивидовых АТ, меченных пероксидазой хрена, с субстрат-хромогенной смесью.

Аналитический сигнал (регистрируемое значение ОП), характеризующий степень взаимодействия АТ с АГ, обратно пропорционален массовой концентрации тилозина в растворе.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

5 Требования безопасности и условия выполнения измерений

5.1 При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать общие требования безопасности обращения с вредными веществами, установленные ГОСТ 12.1.007. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

5.2 Помещения, в которых проводят анализ и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией и соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и электробезопасности по ГОСТ 12.1.019.

5.3 К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих высшее образование, прошедших соответствующий инструктаж, владеющих техникой ИФА и изучивших инструкции по применению тест-систем и инструкции по эксплуатации используемых приборов.

5.4 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха..... от 18 °С до 28 °С;
- относительная влажность воздуха.....от 30 % до 80 %.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

6.1 При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуду:

- весы высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности ±0,01 г;
- весы специального класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом абсолютной допускаемой погрешности не более ±0,4 мг;
- компьютер с установленным программным обеспечением* для управления и обработки результатов измерений;
- анализатор иммуноферментный, позволяющий проводить измерение ОП при длине волны 450 нм, диапазоном измерений ОП от 0,01 до 3,00 ед. ОП с погрешностью измерений ± (0,01ОП + 0,010) при значениях от 0 до 2,0 ед. ОП и ± (0,015ОП + 0,010) при значениях от 2,0 до 3,0 ед. ОП;
- гомогенизатор лабораторный;
- камеру морозильную любого типа, обеспечивающую среднюю температуру не выше минус 18 °С;
- холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры в холодильной камере в диапазоне от 2 °С до 8 °С;
- центрифугу лабораторную с диапазоном температур охлаждения от 4 °С до 20 °С, с бакет-ротором и адаптером для пробирок вместимостью 15 $см^3$, с частотой вращения не менее 3000 об/мин;
- шейкер вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 об/мин;
- термостат любого типа, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;
- шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий поддержание температуры в диапазоне (50 ± 5) °С;
- бумагу масштабно-координатную по ГОСТ 334, марки Н-1;
- бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
- колбы 1—50(100, 250, 500,1000)—2 по ГОСТ 1770;
- колбы конические Кн-1—100(250)—29/32 ТС по ГОСТ 25336;
- колбы со шлифом Кн-1—50(250;1000)—29/32 ЕС по ГОСТ 25336;
- дозаторы пипеточные многоканальные с комплектом одноразовых наконечников с диапазоном объемов дозирования от 0,03 до 0,3 $см^3$ по ГОСТ 28311;
- дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников с диапазоном объемов дозирования 0,005—0,05; 0,1—1,0; 0,5—5,0 $см^3$ по ГОСТ 28311;
- пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и с завинчивающимися крышками;
- пробирки микроцентрифужные вместимостью 1,5 $см^3$;
- цилиндры 1—10(50, 100, 1000)—1 по ГОСТ 1770.

---

* Например, Magellan™ V.7.0, TECAN Austria GmbH, Австрия. Данная инфомация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможности использования другого программного обеспечения с аналогичными характеристиками.

6.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы:

- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- калия бихромат по ГОСТ 2652;
- кислоту серную по ГОСТ 4204, концентрированную;
- кислоту соляную по ГОСТ 3118, концентрированную, плотностью 1,19 г/см^3, х. ч.;
- аммония сульфат по ГОСТ 10873;
- альбумин бычий сывороточный (БСА), фракция V с содержанием основного вещества не менее 96 %;
- тест-систему для непрямого твердофазного конкурентного ИФА в комплектации (см. приложение А), которая предназначена для определения тилозина (тест-систему следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в пределах срока хранения).

6.3 Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования и посуды, не уступающих вышеприведенным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не ниже указанных.

7 Подготовка к проведению иммуноферментного анализа

7.1 Подготовка оборудования

7.1.1 При подготовке к проведению измерений лабораторную стеклянную посуду моют хромовой смесью, многократно промывают водопроводной водой, три раза ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу при температуре (50 ± 5) °С.

7.1.2 Подготовку и проверку иммуноферментного анализатора проводят в соответствии с руководством по эксплуатации прибора.

7.2 Приготовление растворов

7.2.1 Приготовление раствора сульфата аммония с молярной концентрацией 1 моль/дм^3

Навеску сульфата аммония массой 66 г вносят в мерную колбу вместимостью 500 см^3, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и тщательно перемешивают.

Раствор хранят в колбе со шлифом при температуре от 18 °С до 28 °С не более 4 мес.

7.2.2 Приготовление раствора буфера для разведения образцов (ФСБТ)

В мерную колбу вместимостью 250 см^3 вносят 10 см^3 раствора № 1 (см. приложение А), доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и аккуратно перемешивают.

Раствор хранят в колбе со шлифом при температуре от 18 °С до 28 °С не более 1 мес.

7.2.3 Приготовление ФСБТ-БСА

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 0,5 г БСА, 2 см^3 раствора № 1 (см. приложение А), доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и аккуратно перемешивают.

Раствор хранят в колбе со шлифом при температуре от 2 °С до 8 °С не более 7 сут.

7.2.4 Приготовление хромовой смеси

В конической колбе вместимостью 250 см^3 растворяют 5,0 г бихромата калия в 50 см^3 дистиллированной воды, затем добавляют 100 см^3 концентрированной серной кислоты.

Раствор хранят в колбе со шлифом в вытяжном шкафу при температуре от 18 °С до 28 °С не более 1 мес. Если раствор приобретает зеленый оттенок, его готовят заново.

7.2.5 Приготовление раствора буфера для отмывки ОТ

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят 20 см^3 раствора № 1 (см. приложение А), доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и аккуратно перемешивают.

Раствор хранят в колбе со шлифом при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 мес.

7.2.6 Приготовление раствора АТ

В полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см^3 вносят 5,18 см^3 раствора ФСБТ-БСА (см. 7.2.3), добавляют 70 мм^3 раствора № 3 (см. приложение А), закрывают пробирку и аккуратно перемешивают. Указанное количество рабочего разведения АТ предназначено для анализа 40 проб (при внесении в двух повторностях) в соответствии с приложением Б. Для анализа четырех

проб (три стрипа*) необходимо пропорционально уменьшить количество используемых реагентов в четыре раза: 1,295 см^3 раствора ФСБТ-БСА (см. 7.2.3) и 17,5 мм^3 раствора № 3 (см. приложение А).

Используют раствор, приготовленный не более чем за 1 ч до его применения.

7.2.7 Приготовление раствора ФК

В полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см^3 вносят 10 см^3 раствора ФСБТ-БСА (см. 7.2.3), добавляют 2,5 мм^3 раствора № 4 (см. приложение А), закрывают пробирку и аккуратно перемешивают. Указанное количество раствора ФК предназначено для анализа 40 проб (при внесении в двух повторностях) в соответствии с приложением Б. Для анализа четырех проб (три стрипа) необходимо пропорционально уменьшить количество используемых реагентов в четыре раза: 2,5 см^3 раствора ФСБТ-БСА (см. 7.2.3) и 0,6 мм^3 раствора № 4 (см. приложение А).

Используют раствор, приготовленный не более чем за 8 ч до его применения.

7.2.8 Приготовление РС

В полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см^3 вносят 10 см^3 раствора № 5 (см. приложение А), 1 см^3 раствора № 6 (см. приложение А), закрывают пробирку и аккуратно перемешивают. Указанное количество РС предназначено для анализа 40 проб (при внесении в двух повторностях) в соответствии с приложением Б.

Используют раствор, приготовленный не более чем за 10 мин до его применения.

Раствор светочувствителен, поэтому его необходимо беречь от прямых солнечных лучей. Если РС в процессе приготовления окрасился, то его к применению не допускают.

7.2.9 Приготовление градуировочных растворов

7.2.9.1 Приготовление исходного раствора тилозина $K_{исх}$ массовой концентрацией 1000 нг/см^3

В пробирку вместимостью 1,5 см^3 вносят 1000 мм^3 раствора ФСБТ-БСА (см. 7.2.3) и 1 мм^3 раствора № 2 (см. приложение А), закрывают пробкой, перемешивают на шейкере вортексного типа в течение 15 с.

Используют раствор, приготовленный не более чем за 1 ч до его применения.

7.2.9.2 Приготовление градуировочных растворов тилозина K_0—K_6

Градуировочные растворы K_0—K_6 готовят в пробирках вместимостью 1,5 см^3 согласно таблице 1.

Таблица 1

Обозначение и массовая концентрация раствора тилозина	Вносимый объем, мм^3						
	ФСБТ-БСА	исходного раствора $K_{исх}$	раствора K_6	раствора K_5	раствора K_4	раствора K_3	раствора K_2
K_6 (25 нг/см^3)	390	10	—	—	—	—	—
K_5 (10 нг/см^3)	180	—	120	—	—	—	—
K_4 (2 нг/см^3)	240	—	—	60	—	—	—
K_3 (0,5 нг/см^3)	150	—	—	—	50	—	—
K_2 (0,1 нг/см^3)	240	—	—	—	—	60	—
K_1 (0,05 нг/см^3)	100	—	—	—	—	—	100
K_0 (0 нг/см^3)	200	—	—	—	—	—	—

Пробирки закрывают крышками и перемешивают на шейкере вортексного типа в течение 15 с.

Используют растворы, приготовленные не более чем за 8 ч до их применения.

7.3 Отбор проб

7.3.1 Отбор проб молока и молочных продуктов проводят по ГОСТ 26809.1—2014 (подразделы 4.2, 4.3, 4.5).

7.3.2 Отбор проб яиц проводят по ГОСТ 31654.

7.3.3 Отбор проб меда проводят по ГОСТ 19792.

7.3.4 Срок хранения отобранных проб при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 2 сут.

* Стрип — полоска из восьми лунок.

7.4 Подготовка проб

7.4.1 Подготовка проб молока

В полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ помещают (1,00 ± 0,01) г пробы, добавляют 4 $см^3$ 1 М раствора сульфата аммония (см. 7.2.1) и перемешивают 15 мин на шейкере, после чего центрифугируют 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин и температуре 10 °С. Переносят надосадочный слой в чистую пробирку. Полученный раствор используют для проведения ИФА в соответствии с разделом 8.

Используют раствор, приготовленный не более чем за 8 ч до его применения. Коэффициент разведения проб равен пяти. Для получения двух результатов измерений, выполненных в условиях повторяемости, для каждой пробы проводят два параллельных анализа, одновременно подвергнутых процедуре пробоподготовки.

7.4.2 Подготовка проб сливок и сметаны

В полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ помещают (1,00 ± 0,01) г пробы, добавляют 9 $см^3$ 1 М раствора сульфата аммония (см. 7.2.1) и перемешивают 15 мин на шейкере, после чего центрифугируют 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин и температуре 10 °С. Переносят надосадочный слой в чистую пробирку. Полученный раствор используют для проведения ИФА в соответствии с разделом 8.

Используют раствор, приготовленный не более чем за 8 ч до его применения. Коэффициент разведения проб равен 10. Для получения двух результатов измерений, выполненных в условиях повторяемости, для каждой пробы проводят два параллельных анализа, одновременно подвергнутых процедуре пробоподготовки.

7.4.3 Подготовка проб яиц

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе.

В полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ помещают (1,00 ± 0,01) г гомогенизированной пробы, добавляют 10 $см^3$ 1 М раствора сульфата аммония (см. 7.2.1) и перемешивают 15 мин на шейкере вортексного типа при 2500 об/мин, после чего центрифугируют в течение 15 мин при частоте вращения 3000 об/мин и температуре 20 °С. Переносят надосадочный слой в чистую пробирку. Полученный раствор используют для проведения ИФА в соответствии с разделом 8.

Используют раствор, приготовленный не более чем за 8 ч до его применения. Коэффициент разведения проб равен 10. Для получения двух результатов измерений, выполненных в условиях повторяемости, для каждой пробы проводят два параллельных анализа, одновременно подвергнутых процедуре пробоподготовки.

7.4.4 Подготовка проб меда

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

В полипропиленовую пробирку для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ помещают (1,00 ± 0,01) г гомогенизированной пробы, добавляют 9 $см^3$ раствора ФСБТ (см. 7.2.2) и перемешивают 15 мин на шейкере. Доводят раствором ФСБТ (см. 7.2.2) до конечного объема 10 $см^3$. Полученный раствор используют для проведения ИФА в соответствии с разделом 8.

Используют раствор, приготовленный не более чем за 8 ч до его применения. Коэффициент разведения проб равен 10. Для получения двух результатов измерений, выполненных в условиях повторяемости, для каждой пробы проводят два параллельных анализа, одновременно подвергнутых процедуре пробоподготовки.

8 Проведение иммуноферментного анализа

8.1 Общие положения

8.1.1 Замена компонентов набора реагентов на реагенты из тест-систем других партий не допускается.

8.1.2 Окрашивание раствора хромогена (см. приложение А) является признаком порчи и делает невозможным его применение для анализа.

8.1.3 На всех стадиях проведения анализа необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

8.1.4 Для каждого реактива и раствора используют отдельные съемные наконечники пипеточных дозаторов переменной вместимости. Внесение растворов в лунки проводят осторожно, не касаясь наконечниками их дна и стенок.

8.1.5 Каждый раствор проб (см. 7.4) и градуировочные растворы (см. 7.2.9.2) анализируют в двух повторностях (для каждой подготовленной по 7.4 пробы проводят два параллельных анализа).

8.2 Подготовка тест-системы к проведению анализа

Перед использованием тест-систему вынимают из холодильника и выдерживают при температуре от 18 °С до 25 °С не менее 30 мин, после чего аккуратно встряхивают каждый флакон, избегая образования пены. Раствор № 2 (см. приложение А) прогревают в термостате при температуре 37 °С до полного растворения кристаллов солей и тщательно перемешивают.

8.3 Проведение испытания

8.3.1 Из планшета извлекают необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы планшета незамедлительно помещают в оригинальную упаковку и хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности тест-системы.

8.3.2 В лунки планшета вносят по 0,05 см^3 градуировочных растворов K_0—K_6 (см. 7.2.9.2) и растворов анализируемых проб.

Каждый раствор вносят в двойной повторности (лунки-дубли).

Внесение растворов проводят согласно приложению Б.

Далее в каждую лунку планшета вносят по 0,05 см^3 раствора АТ (см. 7.2.6). Содержимое лунок аккуратно перемешивают круговыми движениями по столу. Встряхивания, постукивания планшета по столу недопустимы. Стрипы заклеивают пленкой или закрывают крышкой, инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего содержимое лунок сливают.

8.3.3 В лунки планшета вносят по 0,25 см^3 раствора ОТ (см. 7.2.5) и сливают. Процедуру отмывки повторяют еще два раза. Остатки жидкости интенсивно стряхивают на чистую фильтровальную бумагу.

8.3.4 В лунки планшета вносят по 0,1 см^3 раствора ФК (см. 7.2.7). Содержимое лунок аккуратно перемешивают круговыми движениями по столу. Стрипы заклеивают пленкой или закрывают крышкой, инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего содержимое лунок сливают.

8.3.5 В лунки планшета механическим дозатором вносят по 0,25 см^3 раствора ОТ (см. 7.2.5) и сливают. Процедуру отмывки повторяют еще два раза. Остатки жидкости интенсивно стряхивают на чистую фильтровальную бумагу.

8.3.6 В лунки планшета вносят по 0,1 см^3 РС (см. 7.2.8). Содержание лунок аккуратно перемешивают круговыми движениями по столу и инкубируют в течение 15 мин в темноте при температуре от 18 °С до 25 °С.

8.3.7 В каждую лунку планшета добавляют по 0,1 см^3 стоп-реагента № 7 (см. приложение А), аккуратно перемешивают содержание лунок круговыми движениями по столу.

8.3.8 Помещают планшет в иммуноферментный анализатор и измеряют значения ОП при длине волны 450 нм. Измерение следует провести в течение 30 мин после добавления стоп-реагента № 7.

9 Обработка результатов измерения

9.1 По показателям ОП в лунках-дублях находят средние арифметические значения. Разность значений ОП для них в процентах от среднего не должна превышать 10.

Связывание АТ или относительное поглощение П, %, вычисляют по формуле

$$П = \frac{ОП_к}{ОП_0} \cdot 100, \quad (1)$$

где $ОП_к$ — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочными растворами тилозина K_1—K_6 или экстрактами анализируемых проб;

$ОП_0$ — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочным раствором K_0 (см. приложение Б).

По значениям относительного поглощения, вычисленным для градуировочных растворов и соответствующим известным значениям массовой концентрации тилозина в нанограммах на сантиметр кубический, строят градуировочный график в полулогарифмической системе координат.

9.2 Обработку результатов измерения проводят с помощью программного обеспечения, позволяющего определить массовую долю тилозина в анализируемой пробе. Полученный график характеризуют линейной зависимостью. Градуировочная зависимость считается приемлемой, если рассчитанное программным обеспечением значение коэффициента корреляции составляет не менее 0,98.

9.3 Возможно проведение вычислений с построением линейного графика на масштабно-координатной бумаге с использованием логарифмической оси абсцисс и линейной оси ординат. На оси абсцисс откладывают значения десятичных логарифмов концентрации тилозина в рабочих разведениях градуировочных растворов K_1—K_6, по оси ординат — значения оптической плотности и строят график с использованием линейной зависимости. С помощью градуировочного графика, полученного для растворов экстрактов анализируемых проб, находят логарифм массовой концентрации тилозина. С помощью калькулятора вычисляют его обратное значение (антилогарифм), соответствующее концентрации определяемого содержания тилозина в анализируемой пробе.

9.4 Массовую долю тилозина в анализируемой пробе C, мкг/кг, вычисляют по формуле

$$C = c \cdot R, \tag{2}$$

где c — массовая концентрация тилозина в экстракте анализируемой пробы, определяемая по градуировочному графику, мкг/дм^3;

R — коэффициент пересчета мкг/дм^3 в экстракте анализируемой пробы в мкг/кг, учитывающий разведение при подготовке пробы.

9.5 За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2|C_1 - C_2| \cdot 100}{(C_1 + C_2)} \le r, \tag{3}$$

где C_1, C_2 — результаты двух параллельных определений массовой доли тилозина, мкг/кг;

r — значение предела повторяемости (см. таблицу 2), %.

9.6 Результаты измерений массовой доли тилозина C, мкг/кг, округляют до первого десятичного знака.

9.7 Если условие (3) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данным методом измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие

$$\frac{4 \cdot |C_{макс} - C_{мин}| \cdot 100}{(C_1 + C_2 + C_3 + C_4)} \le CR_{0,95}, \tag{4}$$

где $C_{макс}$, $C_{мин}$ — максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой доли тилозина, мкг/кг;

C_1, C_2, C_3, C_4 — результаты четырех параллельных определений массовой доли тилозина, мкг/кг;

$CR_{0,95}$ — значение критического диапазона для уровня вероятности P = 0,95, вычисляемое по формуле

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r, \tag{5}$$

где $f(n)$ — коэффициент критического диапазона
для n = 4

$$CR_{0,95} = 3,6 \cdot \sigma_r, \tag{6}$$

где σ_r — показатель повторяемости (см. таблицу 2), %;

n — число результатов определений.

9.8 Если условие (4) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики измерений.

9.9 Если массовая доля тилозина выходит за пределы границ диапазона измерений, в журнале приводят запись следующего вида с учетом границы диапазона измерений для конкретной пробы:

- для молока — «массовая доля тилозина менее 0,5 мкг/кг»;
- для молочных продуктов, яиц, меда — «массовая доля тилозина менее 1 мкг/кг».

Признаком положительного результата (обнаружения тилозина) является получение окончательного результата измерений:

- для молока — более 0,5 мгк/кг;
- для молочных продуктов, яиц, меда — более 1 мкг/кг.

Результат анализа может быть подтвержден методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии.

10 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений массовой доли тилозина с расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата $k = 2$, доверительной вероятности $P = 0,95$ и показателями точности, указанными в таблице 2.

Таблица 2 — Показатели точности метода при определении массовой доли тилозина в молоке, сметане, сливках, яйцах и меде

Наименование продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности U_o, %, при коэффициенте охвата $k = 2$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
Молоко	От 0,5 до 100,0 включ.	19	7	9	19
Сливки, сметана	От 1 до 200 включ.	25	6	14	17
Яйца	От 1 до 200 включ.	23	7	11	19
Мед	От 1 до 200 включ.	24	6	12	17

11 Контроль неопределенности результатов измерения

При соблюдении требований настоящего стандарта рекомендуется в ходе анализа каждой серии проб проводить их анализ для контроля с установленным значением содержания тилозина с использованием стандартной процедуры подготовки проб (см. 7.4).

Результаты измерений признают удовлетворительными при выполнении следующего неравенства:

$$|\overline{C} - C| \le \overline{C}U \cdot 0,01, \quad (7)$$

где $\overline{C}$ — среднее арифметическое значение результатов параллельных определений массовой доли тилозина в образце для контроля, мкг/кг;

C — установленное значение массовой доли тилозина в образце для контроля, мкг/кг;

U — значение относительной расширенной неопределенности содержания тилозина для соответствующей матрицы (см. таблицу 2), %.

12 Контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости с применением карт Шухарта

Периодичность контроля стабильности результатов измерений регламентируют в руководстве по качеству лаборатории.

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного)

отклонения промежуточной прецизионности рутинного анализа с изменяющимися факторами «время» и «оператор».

Применяя метод контрольных карт Шухарта, проверяют стабильность этих результатов измерений и оценивают стандартное отклонение промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами «время» и «оператор». После отбора испытуемую пробу от каждой партии подготавливают в лаборатории для анализа. Одну пробу, подвергавшуюся анализу во время смены C_1, анализирует повторно другой оператор в другую смену C_2, и результаты сравнивают. Значение стандартного отклонения промежуточной прецизионности $\sigma_{I(T,O)}$ устанавливают в лаборатории по результатам измерений за предыдущий период. Параметры контрольной карты пределов для каждого диапазона вычисляют следующим образом:

- среднюю линию — по формуле

$$d_2 \cdot \sigma_{I(T,O)} = 1{,}128 \cdot \sigma_{I(T,O)}, \tag{8}$$

где $\sigma_{I(T,O)}$ среднеквадратическое отклонение промежуточной прецизионности, %;

- верхний предел действия — по формуле

$$UCL_{Д} = 3{,}686 \cdot \sigma_{I(T,O)}; \tag{9}$$

- верхний предел предупреждения — по формуле

$$UCL_{П} = 2{,}834 \cdot \sigma_{I(T,O)}. \tag{10}$$

Расхождение w вычисляют по формуле

$$w = \frac{2 \cdot |C_1 - C_2| \cdot 100}{(C_1 + C_2)}. \tag{11}$$

Расхождение w наносят на карту в течение контролируемого периода.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30. После этого проводят оценку стандартного отклонения промежуточной прецизионности $S_{I(T,O)}$ результатов по формуле

$$S_{I(T,O)} = \frac{\sum_{i=1}^{k} w_i}{m_k \cdot d_2}, \tag{12}$$

где w_i — i-е расхождение в течение контролируемого периода;

m_k — число измерений;

d_2 — коэффициент для средней линии.

Полученное значение $S_{I(T,O)}$ используют для последующего контроля стабильности результатов измерений.

Приложение А
(обязательное)

Тест-система «Тилозин — ИФА»

В тест-систему входят:

- планшет 96-луночный (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), покрытый конъюгатами тилозина с БСА;
- пакет полиэтиленовый фольгированный с зип-локом;
- пленка полиэтиленовая самоклеящаяся для заклеивания планшетов.

Растворы:

№ 1 — буфер для промывания (25-кратный концентрат), содержащий раствор гидрофосфата дигидрата натрия молярной концентрации 0,2 моль/дм^3, раствор дигидрофосфата дигидрата натрия молярной концентрации 0,057 моль/дм^3, раствор хлорида натрия молярной концентрации 3,6 моль/дм^3 и 1,25 % Твин-20;

№ 2 — стандартный раствор тилозина, содержащий 1 мг тилозина в 1 см^3 метанола;

№ 3 — раствор поликлональных антител, концентрат (7000-кратный);

№ 4 — конъюгат вторичных антител с пероксидазой хрена, концентрат (4000-кратный);

№ 5 — готовый раствор субстрата — раствор перекиси водорода молярной концентрации 0,0028 моль/дм^3 в водном растворе лимонной кислоты молярной концентрации 0,0312 моль/дм^3;

№ 6 — готовый раствор хромогена — раствор 3,3’,5,5’-тетраметилбензидина молярной концентрации 0,005 моль/дм^3 в смеси диметилсульфоксид: деионизованная вода (7:3);

№ 7 — стоп-реагент — водный раствор серной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Схема заполнения лунок планшета

Внесение реагентов следует проводить согласно схеме, приведенной в таблице Б.1.

Таблица Б.1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K_0	K_0	№ 1	№ 1	№ 9	№ 9	№ 17	№ 17	№ 25	№ 25	№ 33	№ 33
B	K_0	K_0	№ 2	№ 2	№ 10	№ 10	№ 18	№ 18	№ 26	№ 26	№ 34	№ 34
C	K_1	K_1	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11	№ 19	№ 19	№ 27	№ 27	№ 35	№ 35
D	K_2	K_2	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12	№ 20	№ 20	№ 28	№ 28	№ 36	№ 36
E	K_3	K_3	№ 5	№ 5	№ 13	№ 13	№ 21	№ 21	№ 29	№ 29	№ 37	№ 37
F	K_4	K_4	№ 6	№ 6	№ 14	№ 14	№ 22	№ 22	№ 30	№ 30	№ 38	№ 38
G	K_5	K_5	№ 7	№ 7	№ 15	№ 15	№ 23	№ 23	№ 31	№ 31	№ 39	№ 39
H	K_6	K_6	№ 8	№ 8	№ 16	№ 16	№ 24	№ 24	№ 32	№ 32	№ 40	№ 40

Примечание — Для увеличения точности нулевой калибратор K_0 вносят не в двух повторностях, а в четырех.

УДК 664:638.162:637.07:614.3:006.354

МКС 67.050
67.100
67.120
67.180.10

Ключевые слова: тилозин, продукция, иммуноферментный метод, яйца, молоко, молочные продукты, сливки, сметана, мед

Редактор *Е.В. Якубова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *И.Ю. Литовкиной*

Сдано в набор 03.07.2023. Подписано в печать 14.07.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч-изд. л. 1,68.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ 34957—2023 Продукты пищевые. Иммуноферментный метод определения остаточного содержания тилозина

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения

(ИУС № 3 2024 г.)

gost.e-ecolog.ru