СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке БелГИМ

_____ Т.В. Баковец

«05» _____ 2016

УТВЕРЖДАЮ

Управляющий ОДО «КомПродСервис»

_____ Д.Ч. Кучинский

«05» _____ 2016

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора Института биоорганической химии НАН Беларуси

_____ Н.Б. Хрипач

_____ 2016

Извещение № 2 об изменении
МВИ.МН 3951-2015

Методика выполнения измерений содержания антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения с использованием тест-систем Ridascreen®Tetracyclin и ПРОДОСКРИН ®Тетрациклин

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 976 / 2016
об аттестации МВИ от 05.10.2016 г.

МИНСК 2016

gost.e-ecolog.ru

	ИЗ	ИЗВЕЩЕНИЕ № 2	ОБОЗНАЧЕНИЕ ДОКУМЕНТА МВИ.МН 3951-2015
Дата выпуска		Срок изменения	Лист 2 / Листов 2
ПРИЧИНА		Изменение области применения	Код -
УКАЗАНИЕ О ЗАДЕЛЕ			
УКАЗАНИЕ О ВНЕДРЕНИИ			
ПРИМЕНЯЕМОСТЬ			
РАЗОСЛАТЬ		Всем абонентам	
ПРИЛОЖЕНИЕ		На 2 листах	
ИЗМ.		СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ	
2			

Листы 8, 30 заменить.

Составил							
Проверил				Н.контр.			
Изменение внес							

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения 3
2 Точность измерений 3
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы 7
3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы 7
3.2 Реактивы 8
4 Метод измерений 10
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов 10
5.1 Общие требования безопасности 10
5.2 Требования безопасности при работе с метанолом 10
5.3 Требования к квалификации операторов 11
6 Условия выполнения измерений 11
7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении 11
8 Условия хранения тест-систем 11
9 Подготовка к выполнению измерений 12
9.1 Отбор образцов 12
9.2 Подготовка лабораторной посуды 12
9.3 Приготовление растворов 12
9.4 Подготовка тест-систем 13
9.5 Подготовка проб 15
10 Выполнение измерений 23
11 Обработка результатов измерения 24
11.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости 26
12 Оформление результатов измерений 26
12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности 26
12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием предела измерения 27
12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием значения верхней границы диапазона измерений 27
13 Контроль точности результатов измерений 27
13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости. 27
13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности 28
13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 28
13.4 Контроль правильности 30
13.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 31
14 Нормативные ссылки 33
Библиография 35

1 Область применения

Настоящая методика распространяется на сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное и сгущенное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, молочную сыворотку, восстановленную сухую молочную сыворотку, творог и творожные продукты, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженое на молочной основе, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, мясо, готовые мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, жиры животные, шпик, субпродукты, рыбу и продукты из рыбы, яйца, порошок яичный[1], мед и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем Ridascreen ® Tetracyclin производства R-Biopharm AG, Германия, или тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин, производства Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в соответствии с данной методикой определяется как сумма массовых концентраций следующих антибиотиков в пересчете на тетрациклин с учетом перекрестной чувствительности, специфицируемой производителем тест-систем:

- тетрациклина, хлортетрациклина, ролитетрациклина, демеклоциклина, окситетрациклина при использовании тест-систем Ridascreen ® Tetracyclin;
- тетрациклина, хлортетрациклина, окситетрациклина, доксициклина при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин.

Диапазон измерений методики приведен в разделе 2, таблицы 1, 2. Предел измерения для данной методики приведен в разделе 2, таблица 1, 2, как нижняя граница диапазона измерений.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Точность измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в указанном выше диапазоне с показателями прецизионности, приведенными в таблицах 1, 2.

[1]Результат измерений массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в яичном порошке относится к восстановленному согласно ГОСТ 30364.0 продукту

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и воспроизводимости при использовании тест-систем Ridascreen ® Tetracyclin

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение воспроизводимости σ_R, %
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, мороженое на молочной основе, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 1,0 до 18,0 включ.	4,8	7,1
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 3,0 до 36,0 включ.		
Кисломолочные продукты	от 2,0 до 18,0 включ.		
Сыр	от 4,0 до 43,2 включ.	7,4	11
Масло сливочное	от 2,9 до 45,0 включ.		
Творог, творожные продукты	от 2,0 до 18,0 включ.	3,4	8,9
Сгущенное молоко	от 4,0 до 72,0 включ.		
Яйца, порошок яичный	от 6,0 до 108,0 включ.		
Мясо, рыба, продукты из рыбы	от 2,0 до 18,0 включ.	4,4	7,8
Готовые мясные продукты, консервы мясные и мясо-растительные, жиры животные, шпик, субпродукты	от 5,0 до 36,0 включ.		
Мед	от 4,0 до 90,0 включ.		

Таблица 2 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{(IP)}$, %
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, мороженое на молочной основе, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 0,5 до 18,0 включ.	5,3	5,9
Мясо, рыба, продукты из рыбы	от 2,0 до 18,0 включ.		
Готовые мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, жиры животные, шпик, субпродукты	от 5,0 до 36,0 включ.		
Масло сливочное	от 3,0 до 45,0 включ.		
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 3,0 до 36,0 включ.	4,7	5,7
Кисломолочные продукты	от 2,0 до 18,0 включ.		
Сыр	от 4,0 до 43,2 включ.		
Творог, творожные продукты	от 2,0 до 18,0 включ.		
Сгущенное молоко	от 4,0 до 72,0 включ.		
Яйца, порошок яичный	от 6,0 до 108,0 включ.		
Мед	от 4,0 до 90,0 включ.		

В результате оценки показателя правильности для данной методики была установлена незначимость смещения для всех видов продукции во всем диапазоне измерений, за исключением мяса, рыбы, продуктов из рыбы, масла сливочного при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин. Статистическая значимость смещения учтена при оценивании неопределенности для результатов измерений, получаемых для вышеуказанных видов продукции при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин.

Значения оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблицах 3, 4.

Указанные в таблицах 1 – 4 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента, проведенного в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2;
- показатели правильности – СТБ ИСО 5725-4, [1].
- оценки неопределенности - [1], [2].

Таблица 3 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ при использовании тест-систем Ridascreen ® Tetracyclin

Виды продукции	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность, U, %, $K = 2, P = 95$ %
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, мороженое на молочной основе, сухие восстановленные молочные смеси для детского питания	8	16
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка		
Кисломолочные продукты		
Сыр	12	24
Масло сливочное		
Творог, творожные продукты	11	22
Сгущенное молоко		
Яйца, порошок яичный		
Мясо, рыба, продукты из рыбы	9	18
Готовые мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, жиры животные, шпик, субпродукты		
Мед		

Таблица 4 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин

Виды продукции	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K = 2, P = 95$ %
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, мороженое на молочной основе, сухие восстановленные молочные смеси для детского питания	9	18
Готовые мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, жиры животные, шпик, субпродукты		
Мясо, рыба, продукты из рыбы		
Масло сливочное		
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	8	16
Кисломолочные продукты		
Сыр		
Творог, творожные продукты		
Сгущенное молоко		
Яйца, порошок яичный		
Мед		

3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы

3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 500 г, ценой деления не более 0,01 г.

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %).

Программное обеспечение RIDA ® SOFT, разработчик R–Biopharm AG, Германия.

Термометр лабораторный частичного погружения класса точности I с ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498.

pH-метр с диапазоном измерений от 0 pH до14 pH и погрешностью ± 0,1 pH в комплекте с электродами.

Дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников:

- с диапазоном объемов дозирования от 20 мм^3 до 200 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 3,0 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 мм^3 до 1000 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 см^3 до 5 см^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 2 см^3 до 10 см^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,0 %;
- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 50 мм^3 до 350 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более ± 4,6 %.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (пробирки вместимостью 15 см^3, 50 см^3) и не менее 20000 g (пробирки вместимостью 2 см^3), а также охлаждение до плюс 4 °С.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры 40 °С ± 5 °С.

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 20 °С в морозильной камере.

Лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин.

Лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий скорость вращения до 60 об/мин.

Лабораторный миксер, обеспечивающий скорость от 100 об/мин до 200 об/мин, или гомогенизатор (диспергатор) типа «Ultra turrax». Допускается использовать бытовой погружной блендер с плавной регулировкой скорости или миксер со скоростью насадки до 200 об/мин.

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

Пленка «парафильм» или скотч.

Бумага фильтровальная ФБ-II по ГОСТ 12026.

Шпатели пластиковые.

Штатив для пробирок.

Пипетки Пастера.

Флаконы из темной пластмассы вместимостью 20 $см^3$.

Пробирки для центрифугирования с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 2 $см^3$ или 1,5 $см^3$.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$, 50 $см^3$.

Пробирки с завинчивающимися крышками из стекла или полистирола вместимостью 80 $см^3$.

Пробирки стеклянные вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Колбы мерные вместимостью 100 $см^3$, 1000 $см^3$ типа 2–100–2, 2–1000–2 по ГОСТ 1770.

Колбы конические вместимостью 100 $см^3$, 250 $см^3$, 500 $см^3$ типа Кн–1–100–29/32 ТС, Кн–1–250–29/32 ТС, Кн–1–500–29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Воронки типа В-56-80 ХС, В-75-110 ХС по ГОСТ 25336.

Стаканы Н-1 - 100 или Н-1 – 150, Н-2-1000 по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-2-5, 1-2-10, 1-2-20, 1-2-25 по ГОСТ 29169.

Цилиндры мерные вместимостью 25 $см^3$, 50 $см^3$, 250 $см^3$ типа 3–25–2, 3–50–2, 3–250–2 по ГОСТ 1770.

Шприц-фильтр или шприц и фильтрующая насадка на шприц диаметром 15 мм и диаметром пор 0,45 мкм на основе целлюлозы.

Использование следующего оборудования не является обязательным, но рекомендуется для увеличения производительности и повышения точности измерений:

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью не более ± 1 °С;
- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету от 100 $мм^3$ до 350 $мм^3$.

3.2 Реактивы

Метанол ч.д.а по ГОСТ 6995.

н-Гексан ч. по [5].

Натрия фосфат двуосновной дигидрат ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), каталожный номер Fluka 71645 или натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-водный ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) ч.д.а по ГОСТ 4172.

Натрия фосфат одноосновной моногидрат ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), каталожный номер Sigma-Aldrich 71504 или натрий фосфорнокислый однозамещенный, 2-водный ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) ч.д.а по ГОСТ 245.

Натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233.

Натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328.

Кислота янтарная ч.д.а. по ГОСТ 6341.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Набор (компоненты) для приготовления раствора для внесения добавок тетрациклина (spike-раствор), поставляемый производителем тест-систем и обеспечивающий соответствие требованиям п. 13.4.1.

Тест-система Ridascreen ® Tetracyclin (артикул № R3505) производства R-Biopharm AG, Германия в составе (таблица 5) или тест-система ПРОДОСКРИН^{90}Тетрациклин по [3], производства Института биоорганической химии НАН Беларуси, каталожный № 149 – набор реактивов и микротитровальный планшет,

необходимые для выполнения измерений по определению концентрации антибиотиков группы тетрациклинов методом иммуноферментного анализа в составе (таблица 6).

Таблица 5 – Состав тест-системы Ridascreen ® Tetracyclin для определения антибиотиков группы тетрациклинов

Компонент тест-системы	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых конъюгатом тетрациклина с белком)	1 шт
Концентраты для приготовления градуировочных растворов: водные растворы тетрациклина с концентрацией 0,0 мкг/дм^3, 0,5 мкг/дм^3, 1,5 мкг/дм^3, 3,0 мкг/дм^3, 6,0 мкг/дм^3, 18,0 мкг/дм^3	6 шт. × 1,3 см^3
Конъюгат вторичных антител с пероксидазой (раствор, готовый к применению)	1 шт. × 10 см^3
Антитела к тетрациклину (раствор, готовый к применению)	1 шт. × 6 см^3
Субстрат-/хромоген, раствор, окрашенный в красный цвет, содержит тетраметилбензидин	1 шт. × 10 см^3
Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту	1 шт. × 14 см^3
Буфер №1, готовый к применению, используется для разбавления градуировочных растворов и растворов проб	1 шт. × 60 см^3
Буфер №2, готовый к применению, используется для разбавления градуировочных растворов и растворов проб при анализе молочных продуктов	1 шт. × 60 см^3
Моющий буфер, соль для приготовления 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), содержит 0,05 % твина-20	1 уп.

Таблица 6 – Состав тест-системы ПРОДОСКРИН®Тетрациклин для определения антибиотиков группы тетрациклинов

Компонент тест-системы	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых конъюгатом тетрациклина с белком)	1 шт
Концентраты для приготовления градуировочных растворов: водные растворы тетрациклина с концентрацией 0,0 мкг/дм^3, 0,5 мкг/дм^3, 1,5 мкг/дм^3, 3,0 мкг/дм^3, 6,0 мкг/дм^3, 18,0 мкг/дм^3	6 шт. × 1,3 см^3
Конъюгат антивидовых антител с пероксидазой (раствор, готовый к применению)	1 шт. × 10 см^3
Антитела к тетрациклину (раствор, готовый к применению)	1 шт. × 6 см^3
Субстрат	1 шт. × 14 см^3
Хромоген, раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ)	1 шт. × 0,7 см^3
Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту	1 шт. × 14 см^3
Буфер №1, готовый к применению, используется для разбавления градуировочных растворов и растворов проб	1 шт. × 60 см^3
Буфер №2, готовый к применению, используется для разбавления градуировочных растворов и растворов проб при анализе молочных продуктов	1 шт. × 60 см^3
Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1 шт. × 100 см^3

Примечание: в состав тест-системы ПРОДОСКРИН®Тетрациклин вместо растворов хромогена и субстрата может быть включен субстрат-/хромоген в виде готового к использованию раствора – 1 шт. × 12 $см^3$.

Допускается использовать другие средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование по метрологическим и техническим характеристикам, а материалы и реактивы (кроме тест-систем) по качеству не хуже указанных.

4 Метод измерений

Используемый метод основан на взаимодействии антигена (антибиотиков группы тетрациклинов) с антителами. В лунки микротитровального планшета, покрытого конъюгатом тетрациклина с белком, добавляются градуировочные растворы тетрациклина или растворы проб вместе с антителами к тетрациклину. Свободный и иммобилизованный тетрациклин конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА). Несвязанные антитела затем удаляются на стадии промывки и добавляются ферментно маркированные вторичные (антивидовые) антитела, которые связываются с антителами к тетрациклину. После удаления при промывке несвязанных конъюгированных ферментом вторичных антител в лунки добавляется раствор субстрата/хромогена. Связанный конъюгат фермента превращает хромоген в голубой продукт, который при добавлении стоп-реагента меняет свой цвет на желтый. Измеренная при 450 нм оптическая плотность обратно пропорциональна массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в растворе. Массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в пробе определяется по градуировочной зависимости, построенной по 6 градуировочным растворам.

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

При выполнении работ по определению массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов обслуживающий персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности при работе в химической лаборатории в соответствии с инструкциями, утвержденными в установленном порядке;
- техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений.

5.2 Требования безопасности при работе с метанолом

Персонал, работающий с метанолом и его растворами, должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования инструкции по технике безопасности при работе с метанолом, утвержденной в установленном порядке.

Все работы с метанолом и его растворами должны проводиться строго в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты фартуки, перчатки, очки). Запрещается работать с метанолом при выключенной приточно-вытяжной вентиляции и без применения средств индивидуальной защиты.

5.3 Требования к квалификации операторов

К проведению работ по данной методике допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа.

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 ^{0}С.

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

При отсутствии инкубатора микротитровальные планшеты могут инкубироваться в помещении при выполнении следующих условий:

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце.
- при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков с целью устранения возможности испарения содержимого лунок рекомендуется покрывать планшет пленкой «парафильм» или заклеивать скотчем.
- в особых случаях, которые оговорены по тексту МВИ, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например в ящик стола.

8 Условия хранения тест-систем

Хранение тест-систем осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Не допускается замораживание реагентов с целью увеличения их срока хранения и использование тест-систем или их отдельных компонентов по истечении срока хранения, установленного изготовителем.

Хранение неиспользованных стрипов (лунок) осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в плотно закрытом оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся там осушителем.

Необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на светочувствительный раствор хромогена.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб по п. 9.4.5 замороженные образцы должны быть размморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой 2 раза и высушивают.

Запрещается:

- многократное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование бытовых моющих средств для мойки лабораторной посуды.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление 30 % раствора гидроокиси натрия

Навеску гидроокиси натрия массой 15,0 г, взвешенную с точностью до 0,1 г, помещают в коническую колбу вместимостью 250 $см^3$. В колбу приливают 35 $см^3$ дистиллированной воды, отмеренной цилиндром. После растворения гидроокиси натрия раствор охлаждают до комнатной температуры (от плюс 20 °С до плюс 25 °С).

После приготовления раствора его переносят в полиэтиленовую или фторопластовую посуду и хранят при комнатной температуре (от плюс 20 °С до плюс 25 °С) не более трех месяцев.

9.3.2 Приготовление 20 мМ фосфатного буфера

Навески натрия фосфата одноосновного моногидрата массой 0,55 г (или натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного массой 0,62 г), натрия фосфата двуосновного дигидрата массой 2,85 г (или натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного массой 5,73 г), хлористого натрия массой 9,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, перемешивают до полного растворения и доводят до метки дистиллированной водой. После приготовления раствора его переносят в стакан вместимостью 1000 $см^3$ и доводят pH раствора до 7,4, добавляя по каплям 30 % раствор гидроокиси натрия, приготовленный по п. 9.3.1. pH раствора проверяют с помощью pH-метра. Раствор хранят при комнатной температуре (от плюс 20 °С до плюс 25 °С) не более одного месяца.

9.3.3 Приготовление раствора метанола (1:9 по объему)

В коническую колбу вместимостью 500 $см^3$ приливают 225 $см^3$ дистиллированной воды, отмеренные цилиндром, затем приливают отмеренные цилиндром 25 $см^3$ метанола и перемешивают. Хранят раствор при комнатной

температуре (от плюс 20 °С до плюс 25 °С) в плотно закрытой посуде из темного стекла не более одного месяца в соответствии с установленными правилами хранения метанола и его растворов.

9.3.4 Приготовление раствора метанола (2:8 по объему)

В коническую колбу вместимостью 500 см^3 приливают 200 см^3 дистиллированной воды, отмеренные цилиндром, затем приливают отмеренные цилиндром 50 см^3 метанола и перемешивают. Хранят раствор при комнатной температуре (от плюс 20 °С до плюс 25 °С) в плотно закрытой посуде из темного стекла не более одного месяца в соответствии с установленными правилами хранения метанола и его растворов.

9.3.5 Приготовление 50 мМ раствора янтарной кислоты

Навеску янтарной кислоты массой 5,90 г, взвешенную с точностью до 0,01 г, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, перемешивают до полного растворения и доводят до метки дистиллированной водой. После приготовления раствора его переносят в стакан вместимостью 1000 см^3 и доводят pH раствора до 4,0, добавляя по каплям 30 % раствор гидроокиси натрия, приготовленный по п. 9.3.1. pH раствора проверяют с помощью pH-метра. Раствор хранят в холодильнике при температуре от 4 ^{0}С до 8 ^{0}С в закрытой посуде из химически стойкого стекла в течение одного месяца.

9.4 Подготовка тест-систем

9.4.1 Предварительная подготовка и правила обращения с тест-системами

Тест-систему извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С от 0,5 до 1 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

Растворы из тест-системы следует готовить непосредственно перед проведением ИФА. Перед использованием реагенты необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов.

Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-систем других партий не допускается.

Не допускается использование реагентов, имеющих следующие признаки распада:

- голубая окраска раствора хромогена до внесения его в лунки;
- оптическая плотность градуировочного раствора № 1 с концентрацией 0,0 мкг/дм^3 меньше 0,6.

9.4.2 Подготовка микротитровального планшета

Количество лунок микротитровального планшета, необходимых для проведения измерений N_w, рассчитывается по формуле

$$N_w = 12 + 2N_{SMP}, \quad (1)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленными в соответствии с п. 9.4.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок $N_м$. Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 8.

Размечают положения лунок, предназначенные для градуировочных растворов и растворов проб, согласно рисунку 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	С-1	С-1	П-3	П-3	П-11	П-11						
B	С-2	С-2	П-4	П-4	П-12	П-12						
C	С-3	С-3	П-5	П-5	П-13	П-13						
D	С-4	С-4	П-6	П-6	П-14	П-14						
E	С-5	С-5	П-7	П-7	П-15	П-15						
F	С-6	С-6	П-8	П-8	П-16	П-16						
G	П-1	П-1	П-9	П-9	П-17	П-17						
H	П-2	П-2	П-10	П-10	П-18	П-18						

Рисунок 1 - Схема расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб

где *С*-1, *С*-2, ... *С*-6 – градуировочные растворы,

П-1, *П*-2, ... *П*-18 - анализируемые пробы,

1,2,3....12 - номера стрипов в планшете,

A, B, ... H - обозначения лунок в стрипах.

При необходимости одновременно использовать более 6-ти стрипов рекомендуется выполнять анализ в несколько этапов.

9.4.3 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Градуировочные растворы тетрациклина готовят непосредственно перед выполнением ИФА путем разбавления их концентратов, подготовленных по п. 9.4.1.

В шесть стеклянных пробирок вместимостью 5 см^3, промаркированных номерами приготавливаемых градуировочных растворов (от 1 до 6), дозатором приливают 450 мм^3 буфера №1 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб. При анализе проб молока, мороженого, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, кисломолочных продуктов, творога и творожных продуктов вместо буфера №1 используют буфер №2.

Отбирают дозатором по 50 мм^3 каждого концентрата градуировочного раствора и переносят в соответствующую пробирку. Тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе. Для каждого раствора используют новый наконечник дозатора. После отбора аликвот флаконы с концентратами градуировочных растворов убирают в холодильник и хранят в соответствии с п. 8.

9.4.4 Приготовление моющего буфера

При использовании тест-систем Ridascreen ® Tetracyclin в зависимости от планируемого срока использования моющий буфер готовят двумя приведенными ниже

способами.

- **Способ 1.** Содержимое пакета для приготовления моющего буфера количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$. Добавляют 50 – 100 $см^3$ количество дистиллированной воды, содержимое колбы перемешивают до полного растворения осадка, после чего доводят до метки дистиллированной водой. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 6-ти недель в стеклянной или полиэтиленовой посуде.
- **Способ 2.** Содержимое пакета для приготовления моющего буфера количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Добавляют 50 – 60 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения осадка и доводят до метки дистиллированной водой. Полученный концентрированный раствор (10-кратное концентрирование) хранят при температуре от плюс 20°С до плюс 25 °С не более 12 недель. Для приготовления готового раствора моющего буфера 10 $см^3$ концентрата переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят до метки дистиллированной водой.

При использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин моющий буфер готовят следующим образом. Содержимое флакона с концентратом моющего буфера интенсивно встряхивают в течение (10-20) с, в случае образования кристаллов – подогревают на водяной бане при температуре 50 °С. Отмеренный мерным цилиндром необходимый объем концентрата наливают в стакан вместимостью 1000 $см^3$, после чего в стакан наливают в 9 раз больший объем дистиллированной воды и перемешивают. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.4.5 Приготовление раствора субстрата/хромогена (только при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин)

Раствор субстрата/хромогена готовят непосредственно перед выполнением ИФА из растворов субстрата и хромогена, подготовленных по п. 9.4.1. Посуда, используемая при приготовлении раствора субстрата/хромогена, моется без применения синтетических моющих средств.

В чистый флакон из темной пластмассы вместимостью 20 $см^3$ приливают необходимое количество субстрата, отмеренного дозатором и добавляют в 20 раз меньшее по объему количество раствора хромогена, интенсивно перемешивают в течение (30-40) с. Приготовленный раствор необходимо предохранять от воздействия света. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Объем используемой аликвоты V, $см^3$, раствора хромогена рассчитывается на основании количества используемых в анализе лунок микротитровального планшета $N_м$, по формуле

$$V = \frac{0{,}1 \cdot N_м + V_1}{21}, \qquad (2)$$

где V_1 – объем раствора субстрата/хромогена, приготавливаемого в запас, $см^3$ (не менее 0,1 $см^3$).

9.5 Подготовка проб

9.5.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного и

восстановленного сухого молока, мороженого

9.5.1.1 Восстановление сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

В стаканы вместимостью 100 $см^3$ или 150 $см^3$ помещают 2 параллельные навески образца сухого молока, взвешенные с точностью до 0,1 г. Массы навесок в зависимости от содержания жира составляют:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;
- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5 – 10 $см^3$ приливают дистиллированную воду, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения сухого молока растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$, выдерживают в течение 15 мин, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Восстановление проб сухих смесей для детского питания производят по приведенной выше схеме, используя отношение массы смеси к объему воды, указанное в инструкции производителя.

Далее пробы подвергают процедуре обезжиривания, описанной в п. 9.5.1.2, пробы сухого обезжиренного молока обезжириванию не подлежат.

9.5.1.2 Получение проб обезжиренного сырого, стерилизованного, пастеризованного, восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания и мороженого

Для подготовки проб используют образец сырого, стерилизованного, пастеризованного молока или мороженого отобранный в соответствии с п. 9.1. От образца мороженого предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Температуру образца доводят от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Перед взятием аликвоты образец перемешивают путем встряхивания и переворачивания упаковки. Затем его переносят в коническую колбу вместимостью 100 $см^3$ в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

От образца сырого, стерилизованного, пастеризованного молока, подготовленного как описано выше, или восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, приготовленных по п. 9.5.1.1, с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 10 $см^3$ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. От образца мороженого отбирают параллельные навески массой 10,0 г и и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. Центрифугируют пробы в следующем режиме: 10 °С, 3000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием

выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая их до температуры от плюс 2 °С до плюс 4 °С, контролируя температуру термометром.

Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности после центрифугирования.

Отбирают по 2 $см^3$ обезжиренной пробы из каждой пробирки и переносят в чистые пробирки (перед тем как вылить молоко в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления следов жира). При необходимости пробы хранят в соответствии с п. 9.1.

Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

9.5.1.3 Получение растворов проб молока, мороженого, молочных смесей

В стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ вносят отобранные дозатором 450 $мм^3$ буфера №2 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб. Из каждой пробы, подготовленной по пп. 9.5.1.1 или 9.5.1.2, отбирают дозатором по 50 $мм^3$ и переносят в пробирки с буфером, предварительно очистив наконечник дозатора фильтровальной бумагой от следов жира. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение часа.

9.5.2 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки

9.5.2.1 Восстановление сухой молочной сыворотки

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

В стаканы вместимостью 100 $см^3$ или 150 $см^3$ помещают 2 параллельные навески образца массой 12,5 г, взвешенные с точностью до 0,1 г.

Затем приливают небольшими порциями по 10 – 20 $см^3$ дистиллированную воду, нагретую до температуры (40 ± 2) ^{0}С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения навески растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

9.5.2.2 Получение растворов проб молочной сыворотки и восстановленной сухой молочной сыворотки

Для получения растворов проб используют образец молочной сыворотки, отобранный в соответствии с п. 9.1, температуру которого доводят от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая при комнатной температуре.

В стаканы вместимостью 150 $см^3$ наливают по 70 - 90 $см^3$ проб молочной сыворотки, подготовленных как описано выше, или проб восстановленной сухой молочной сыворотки, приготовленных по п. 9.5.2.1, и доводят их pH до 7,0, добавляя по каплям 30 % раствор гидроокиси натрия, приготовленный по п. 9.3.1.

Дозатором отбирают 950 мм^3 буфера №2 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб и переносят в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3. В пробирки с буфером переносят из стаканов с помощью дозатора по 50 мм^3 каждой пробы с доведенным pH. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение часа.

9.5.3 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца меда отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки с завинчивающимися крышками из стекла или полистирола вместимостью 80 см^3. В каждую пробирку добавляют, отмеренные цилиндром, 49,0 см^3 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 9.3.2. Содержимое пробирок растворяют путем интенсивного встряхивания, после чего дополнительно перемешивают на вортексе 2 мин.

Допускается использовать для растворения меда конические колбы вместимостью 100 см^3.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают путем переворачивания пробирок несколько раз.

9.5.4 Подготовка проб мяса, рыбы, продуктов из рыбы

9.5.4.1 Получение экстрактов проб мяса, рыбы, продуктов из рыбы

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 9 см^3 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 9.3.2. Перемешивают содержимое пробирок, после чего интенсивно (200 – 300 об/мин) встряхивают на шейкере или ротаторе в течение 10 мин. Центрифугируют пробирки при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин.

9.5.4.2 Получение растворов проб мяса, рыбы, продуктов из рыбы

После центрифугирования переносят по 1 см^3 надосадочной жидкости в новые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3.

При анализе проб рыбы с высоким содержанием жира или проб мяса проводят дополнительное обезжиривание проб. Для этого в пробирки добавляют отобранные дозатором 2 см^3 гексана и перемешивают их содержимое на вортексе в течение 10 с.

Центрифугируют пробирки при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. Осторожно удаляют верхний гексановый слой с помощью пипетки Пастера или дозатором.

Полученные водные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

9.5.5 Подготовка проб готовых мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, жиров животных, шпика, субпродуктов

9.5.5.1 Получение экстрактов проб готовых мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, жиров животных, шпика, субпродуктов

Доводят температуру образцов, отобранных в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая их при комнатной температуре, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 3,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в стаканы вместимостью 150 $см^3$ или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам добавляют отмеренные дозатором 30 $см^3$ 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 9.3.2. Стаканы с пробами жиров животных, шпика нагревают до температуры (40 ± 5) ^{0}С при помешивании. Смесь гомогенизируют с помощью лабораторного миксера, не допуская ее разбрызгивания. Гомогенизация также может быть проведена с использованием гомогенизатора в соответствии с его эксплуатационными документами.

Гомогенизированную смесь переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$ и центрифугируют в следующем режиме: 10 °С, 4000 g, 10 мин.

9.5.5.2 Получение обезжиренных проб готовых мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, жиров животных, шпика, субпродуктов

При анализе проб с высоким содержанием жира проводят их обезжиривание гексаном. Для этого переносят по 1 $см^3$ надосадочной жидкости, полученной по п. 9.5.5.1 в новые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. В пробирки добавляют отобранные дозатором 2 $см^3$ гексана и перемешивают их содержимое на вортексе в течение 10 с. Центрифугируют пробирки при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. Осторожно удаляют верхний гексановый слой с помощью пипетки Пастера или дозатором.

9.5.5.3 Получение растворов проб готовых мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, жиров животных, шпика, субпродуктов

Переносят по 200 $мм^3$ надосадочной жидкости, полученной по п. 9.5.5.1 или п. 9.5.5.2, в пробирки для центрифугирования вместимостью 1,5 $см^3$ или 2 $см^3$. В каждую пробирку добавляют отобранные дозатором 200 $мм^3$ буфера №1 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб и перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 10 с.

Полученные водные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

9.5.6 Подготовка проб сыра

9.5.6.1 Получение экстрактов проб сыра

Доводят температуру образца сыра, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают.

От измельченного образца сыра отбирают две параллельные навески массой 15,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г. Навески помещают в стаканы вместимостью 150 $см^3$ или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам сыра добавляют отмеренные пипеткой 30 $см^3$ раствора метанола (1:9 по объему), приготовленного по п. 9.3.3. Смесь гомогенизируют с помощью лабораторного миксера, не допуская ее разбрызгивания.

Переносят гомогенизированную смесь в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$ и выдерживают пробирку на водяной бане при температуре (40 ± 5) °С в течение 10 мин. За это время смесь перемешивают три раза, энергично встряхивая пробирку.

Центрифугируют пробирку при 4 °С, 3000 g, в течение 15 мин.

Переносят дозатором 1 $см^3$ среднего водного слоя в пробирку для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$. Пробирку центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 20000 g, в течение 5 мин.

При отсутствии центрифуги, обеспечивающей режим центрифугирования 20000 g, удаляют верхний слой жира пластиковым шпателем, после чего фильтруют оставшийся водный слой через складчатый фильтр.

9.5.6.2 Получение растворов проб сыра

Отбирают дозатором 50 $мм^3$ надосадочного слоя или фильтрата по п. 9.5.6.1 и переносят в стеклянную пробирку вместимостью 5 $см^3$. Затем в пробирку дозатором добавляют 450 $мм^3$ буфера №1 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб, и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

9.5.7 Подготовка проб масла

9.5.7.1 Получение экстрактов проб масла

Образец масла, отобранный в соответствии с п. 9.1, охлажденный до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца масла от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

От образца масла отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. Выдерживают пробирки на водяной бане при температуре (40 ± 5) °С до полного расплавления навески масла.

Сразу же после расплавления масла в пробирки с пробами добавляют 1 $см^3$ гексана, отмеренного дозатором, и интенсивно перемешивают на вортексе в течение

1 мин. Добавляют в пробирки отмеренный дозатором 1 $см^3$ раствора метанола (2:8 по объему), приготовленного по п. 9.3.4. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе в течение 10 с, после чего продолжают перемешивание при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин.

Центрифугируют пробирки при 4 °С, 2000 g, в течение 10 мин. Осторожно удаляют верхний гексановый слой с помощью пипетки Пастера.

В пробирки с пробами снова добавляют 1 $см^3$ гексана, отмеренного дозатором, и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Повторяют центрифугирование при 4 °С, 2000 g, в течение 10 мин, после чего осторожно удаляют верхний гексановый слой пипеткой Пастера.

1 $см^3$ водного слоя переносят дозатором в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$. Пробирки помещают на лед и выдерживают в течение 15 мин. После этого проводят центрифугирование при температуре от 20 °С до 25 °С, 20000 g, в течение 5 мин. При отсутствии центрифуги, обеспечивающей вышеуказанный режим, вместо центрифугирования проводят фильтрование через шприц-фильтр.

9.5.7.2 Получение растворов проб масла

Отбирают дозатором 50 $мм^3$ водной фазы по п. 9.5.7.1 и переносят в стеклянную пробирку вместимостью 5 $см^3$. Затем в пробирку дозатором добавляют 800 $мм^3$ буфера №1 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб, и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

9.5.8 Подготовка проб сгущенного молока

9.5.8.1 Получение восстановленного сгущенного молока

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 100 $см^3$ или 150 $см^3$ помещают 2 параллельные навески образца массой 25,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5 – 10 $см^3$ приливают дистиллированную воду, нагретую до температуры 30 °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения образца содержимое стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Далее пробы восстановленного сгущенного молока подвергают процедуре обезжиривания, описанной в п. 9.5.8.2, для проб восстановленного обезжиренного сгущенного молока эту процедуру не производят.

9.5.8.2 Получение обезжиренного восстановленного сгущенного молока

С помощью дозатора отбирают пробы восстановленного сгущенного молока, приготовленные по п. 9.5.8.1, объемом 10 $см^3$ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. Центрифугируют пробы в следующем режиме: 10 °С, 3000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая их до температуры от плюс 7 °С до плюс 8 °С, контролируя температуру термометром.

Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности после центрифугирования.

Отбирают по 2 $см^3$ обезжиренной пробы и переносят в чистые пробирки (перед тем как вылить пробу в пробирку, наконечник дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления следов жира). При необходимости пробы хранят в соответствии с п. 9.1.

9.5.8.3 Получение растворов проб сгущенного молока

В стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ вносят отобранные дозатором 450 $мм^3$ буфера №2 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб. Из каждой пробы, подготовленной по п. 9.5.8.1 или 9.5.8.2, отбирают дозатором по 50 $мм^3$ и переносят в пробирки с буфером, предварительно очистив наконечник дозатора фильтровальной бумагой от следов жира. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение часа.

9.5.9 Подготовка проб яиц, яичного порошка

9.5.9.1 Получение экстрактов проб яиц, яичного порошка

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Образец яичного порошка перемешивают и восстанавливают в соответствии с п. 5.2.2 ГОСТ 30364.0. Перед отбором навесок восстановленный яичный порошок тщательно перемешивают. Яйца освобождают от скорлупы и гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца яиц или восстановленного яичного порошка отбирают две параллельные навески массой 4,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой 20 $см^3$ 50 мМ раствора янтарной кислоты, приготовленного по п. 9.3.5. Содержимое пробирок перемешивают путем встряхивания на шейкере или переворачивания на ротаторе в течение 15 мин.

Затем пробирки центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g в течение 15 мин.

9.5.9.2 Получение растворов проб яиц, яичного порошка

Отбирают дозатором 100 $мм^3$ надосадочного слоя по п. 9.5.9.1 и переносят в стеклянную пробирку вместимостью 5 $см^3$. Затем в пробирку дозатором добавляют 900 $мм^3$ 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 9.3.2. и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс

25 °С в течение одного часа.

9.5.10 Подготовка проб творога, творожных продуктов, кисломолочных продуктов

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего перемешивают. При наличии в образце немолочных компонентов, в т.ч. глазури, их отбрасывают. Образцы творога, творожных продуктов гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 5,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. Пробирки выдерживают на водяной бане при температуре 50 °С в течение 15 мин, после чего сразу же перемешивают на вортексе до образования гомогенной смеси.

Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 10 °С, 4000 g, 10 мин. Переносят по 100 $мм^3$ надосадочной жидкости по п. 9.5.5.1 в новые пробирки для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$. В каждую пробирку добавляют отобранные дозатором аликвоту буфера №2 для разбавления градуировочных растворов и растворов проб следующим объемом:

- 1000 $мм^3$ – для проб сметаны жирностью выше 15 % и творога (творожных продуктов) жирностью выше 5 %;
- 900 $мм^3$ – для остальных проб.

Перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 10 с.

Полученные водные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

10 Выполнение измерений

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.4.5. Компоненты тест-систем подготавливают в соответствии с п. 9.4.

10.1 В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.4.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 50 $мм^3$ каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00; 0,05; 0,15; 0,30; 0,60; 1,80 мкг/$дм^3$).

10.2 В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 50 $мм^3$ двух параллельных проб каждого образца.

10.3 В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 50 $мм^3$ раствора антител. Аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают содержимое. Встряхивания, постукивания планшетом по столу не допустимы.

10.4 Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 60 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 60 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

10.5 По окончании инкубации жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета.

10.6 Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 моющего буфера, приготовленного по п. 9.4.4, и затем выливая его резким переворачиванием планшета. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

Примечание: В процессе работы следует избегать высыхания лунок в перерывах между отдельными этапами работы и увеличения перерывов. Точность результатов измерений зависит от равномерного промывания лунок, поэтому следует точно соблюдать процесс промывки. Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для промывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – от 3 до 4, объем используемого промывочного раствора – 250 мм^3.

10.7 В каждую лунку вносят дозатором по 100 мм^3 раствора конъюгата вторичных (антивидовых) антител и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают его содержимое.

10.8 Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 15 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 15 мин при условиях, указанных в разделе 7.

10.9 По окончании инкубации жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета.

10.10 Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 моющего буфера, приготовленного по п. 9.4.4, и затем выливая его резким переворачиванием планшета. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

10.11 В каждую лунку планшета дозатором вносят по 100 мм^3 раствора субстрата/хромогена. Аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают его содержимое.

10.12 Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 15 мин. Отсчет времени инкубации начинают немедленно после окончания внесения раствора субстрата/хромогена. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте, при условиях, указанных в разделе 7.

10.13 Сразу же после окончания инкубации в каждую лунку планшета дозатором вносят по 100 мм^3 раствора стоп-реагента в той же последовательности и с той же скоростью, которые использовались при добавлении раствора субстрата/хромогена и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают его содержимое.

10.14 В течение 15 мин после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке планшета на автоматическом микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

11 Обработка результатов измерения

Обработка результатов измерений оптической плотности производится с помощью программного обеспечения "RIDA®Soft", разработанного R-Biopharm AG

(Германия), далее «программное обеспечение».

Примечание: техническая помощь и поддержка программного обеспечения осуществляется официальным представителем компании R-Biopharm в РБ - ОДО «КомПродСервис» при предоставлении протоколов, выданных вышеуказанным программным обеспечением.

Программное обеспечение автоматически осуществляет:

- построение градуировочной зависимости концентрация – относительная оптическая плотность ($100 B_i / B_0$), где B_i – оптическая плотность i –го градуировочного раствора ($i = 2..6$), B_0 – оптическая плотность 1–го градуировочного раствора с концентрацией 0,0 мкг/кг тетрациклина;
- расчет фактического значения массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в пробах на основании рассчитанного значения относительной оптической плотности и задаваемого оператором фактора разбавления.

Для получения результата измерений задают следующие настройки:

- фактор разбавления (Samples→Dilution factor) согласно таблице 7;
- количество параллельных определений образца (Samples→Replicates) – 1;
- количество параллельных определений градуировочного раствора (Standards→Replicates) – 2.

Таблица 7 – Факторы разбавления

Виды проб	Значения фактора разбавления
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, восстановленные сухие смеси для детского питания, творог, творожные продукты, кисломолочные продукты, мороженое на молочной основе, мясо, рыба, продукты из рыбы	10
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, готовые мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, жиры животные, шпик, субпродукты	20
Сгущенное молоко	40
Сыр	24
Яйца, порошок яичный	60
Мед	50
Масло сливочное 50 % жирности	25
Масло сливочное 65 %, 67 % жирности	22,5
Масло сливочное 70 %, 72,5 % жирности	21,5
Масло сливочное 75 %, 78 % жирности	20,5
Масло сливочное 82,5 %, 84 % жирности	19,5

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.1

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

где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой концентрации антибиотиков

группы тетрациклинов в параллельных пробах, мкг/кг, полученные при помощи программного обеспечения.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений, приведенный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием предела измерения согласно п. 12.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, приведенное в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 12.3.

11.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Рассчитывают расхождение между результатами измерений параллельных проб одного образца $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости r_{abs}. Если выполняется условие

$$|X_1 - X_2| \le r_{abs}, \quad (4)$$

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

Абсолютное значение предела повторяемости r_{abs}, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$r_{abs} = 0{,}01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (5)$$

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений параллельных проб одного образца, мкг/кг;

r - относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблицах 9, 8, %.

При невыполнении условия (4) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$\left(\bar{X} \pm U(X)\right), \text{ мкг/кг}$$

при доверительной вероятности P = 0,95, K=2

где $\bar{X}$ – результат измерений, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 11;

$U(X)$ – расширенная неопределенность результатов измерений, мкг/кг.

Расширенную неопределенность результата измерений $U(X)$, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$U(X) = 0{,}01 \cdot U \cdot \overline{X}, \quad (6)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с МВИ, %, приведенная в таблице 3.

При необходимости может быть проведена оценка расширенной неопределенности измерений, выполняемых в соответствии с данной МВИ при ее реализации в конкретной лаборатории.

12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием предела измерения

Если окончательный результат измерений $\overline{X}$ оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ}, указанный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

$$менее\ X_{LQ},$$

где X_{LQ} – конкретное значение предела измерений, указанное в разделе 1.

12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если окончательный результат измерений $\overline{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL}, указанный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

$$более\ X_{HL},$$

где X_{HL} – конкрстное значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 1.

13 Контроль точности результатов измерений

Контроль точности измерений выполняется с периодичностью, установленной системой менеджмента качества в лаборатории, но обязательно:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, влияющих на стабильность процесса по результатам анализа контрольных карт;
- при значимых изменениях в условиях измерений (другая партия реагентов, новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.);
- при любых выявленных несоответствиях в работе лаборатории, применительно к методике выполнения измерений.

13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации антибиотиков группы тетрациклинов при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определении в соответствии

с п. 11.1.

13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин, полученных в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами оператор-время, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\overline{X_1}, \overline{X_2}$ согласно разделу 10, варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.1. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\overline{X_1}, \overline{X_2}$

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X_1} + \overline{X_2}}{2}, \tag{7}$$

при их соответствии условию (8)

$$\left|\overline{X_1} - \overline{X_2}\right| \le \mathrm{CD}_{\text{абс}}, \tag{8}$$

где $CD_{абс}$ – абсолютное значение критической разности, мг/кг, рассчитываемое по формуле

$$CD_{абс} = 0{,}01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \tag{9}$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 8, %.

Таблица 8 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Мясо, рыба, продукты из рыбы, масло сливочное	15	13	16
Мясорастительные консервы, готовые мясные продукты, жир, сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, молочные коктейли, мороженое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	15	13	14
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, сыр, сгущенное молоко, творог, творожные продукты, кисломолочные продукты, яйца, порошок яичный, мед	13	13	14

13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений при использовании тест-систем Ridascreen ® Tetracyclin, полученных в условиях воспроизводимости проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.1.

Рассчитывают среднее арифметическое значение $\overline{\overline{X}}$, мкг/кг, результатов измерений двух лабораторий $\bar{X}_1$ и $\bar{X}_2$ соответственно

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} \qquad (10)$$

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$, полученными в двух лабораториях, значение, которого сравнивают с абсолютным значением критической разности CD_{abs}. Если выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq \mathrm{CD}_{abs}, \qquad (11)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (10) может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности CD_{abs}, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$CD_{abs} = 0{,}01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \qquad (12)$$

где $\overline{\overline{X}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений двух лабораторий, мкг/кг;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 9.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 5 СТБ ИСО 5725-6.

Таблица 9 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании тест-систем Ridascreen ® Tetracyclin

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{стк.}$, %
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, мороженое на молочной основе, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, кисломолочные продукты, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	14	18	13
Сыр, масло сливочное	21	27	20
Творог, творожные продукты, сгущенное молоко, яйца, порошок яичный	10	24	17
Мясо, готовые мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, жиры животные, шпик, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, мед	13	20	15

13.4 Контроль правильности

Контроль правильности определения массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением концентрации вещества (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок тетрациклина. Неопределенность аттестованного значения массовой концентрации тетрациклина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

13.4.1 ОК, представляющим собой рабочие пробы с добавкой

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в которой менее предела измерения данной МВИ, в которую внесена добавка раствора тетрациклина. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов X_{am} в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \qquad (13)$$

где C_{ST} – концентрация раствора тетрациклина, нг/см^3;

V_{ST} – объем раствора тетрациклина, см^3;

m – масса навески пробы, г.

Примечание: принимается, что для сырого, пастеризованного, стерилизованного молока масса m численно равна объему аликвоты, см^3.

Для внесения добавки используют раствор тетрациклина, приготовленный из набора (компонентов) для приготовления spike-раствора. Значение концентрации в растворе для добавки (spike-раствор) должно обеспечивать возможность внесения добавки тетрациклина ко всем видам продукции согласно области применения во всем диапазоне измерений МВИ. Относительная стандартная неопределенность массовой концентрации тетрациклина в растворе для добавки должна быть не более 3 %, относительная стандартная неопределенность добавляемого объема spike-раствора – не более 1,5%.

13.4.2 Проведение контрольной процедуры

При проведении контрольной процедуры для мяса, рыбы, продуктов из рыбы, масла сливочного при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин получают серию из шести результатов измерений ОК в условиях повторяемости в соответствии с требованиями раздела 10 . При проведении контрольной процедуры для остальных видов продукции получают два результата измерений параллельных проб ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения, $\overline{X_K}$, мкг/кг, принимают:

- при проведении контрольной процедуры для мяса, рыбы, продуктов из рыбы, масла сливочного при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Тетрациклин – результат измерения массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, рассчитанный по формуле (14), при выполнении условия повторяемости по п. 11.1 с использованием вместо относительного предела повторяемости r , приведенного в таблице 9, значения $1{,}43 \cdot r$;
- при проведении контрольной процедуры в остальных случаях –результат измерения массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, рассчитанный по формуле (10) при выполнении условия повторяемости по п. 11.1.

$$\overline{X_K} = \frac{\sum_{i=1}^{6} X_i}{6}, \qquad (14)$$

где X_i - i-ый результат измерений ОК, мкг/кг.

Критерием приемлемости является условие

$$\left|\overline{X_K} - X_{атт}\right| \le 0{,}01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{X_K}, \qquad (15)$$

где $K_{отн}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблицах 8, 9.

$X_{атт}$ – установленное значение массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (15) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)

С помощью КК контролируют следующие показатели точности:

- повторяемость (R-карта или карта размахов);
- наличие смещения или правильность (Recovery-карта).

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [4] и СТБ ИСО 5725-6, раздел 6.

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости в соответствии с таблицей 1.

Примечание: При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы данные измерений, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики может быть заявлено только в том случае, если показатель повторяемости, рассчитанный по накопленным лабораторией данным, статистически не превышает установленных методикой значений.

Для построения и ведения R-карт в качестве образцов для контроля (ОК) могут использоваться рабочие образцы.

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора тетрациклина, приготовленного из тетрациклина гидрохлорида в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Предварительно установленная массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку тетрациклина в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

13.5.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1{,}128 \cdot \sigma_r, \qquad (16)$$

где σ_r – относительное СКО повторяемости, %, приведенное в таблице 1.

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^{1} \cdot \sigma_r = 2{,}834 \cdot \sigma_r \qquad (17)$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3{,}686 \cdot \sigma_r \qquad (18)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных X_1, X_2 при выполнении испытаний ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчета фактических относительных значений размаха W по формуле (19), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \qquad (19)$$

где X_1, X_2 – значение результатов измерений в условиях повторяемости.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [2], п. 7.

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формулам (19), (20)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^{N} W_i \Big/ N}{d_2}, \qquad (20)$$

где N – общее число измерений (точек) на КК, для получения значений центральной линии и границ необходимо, чтобы $N = 15..20$;
d_2 – коэффициент, d_2=1,128.

13.5.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$\overline{\mathrm{Re}c} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Re}c_i}{N}, \qquad (21)$$

где N – количество измерений для расчета значений центральной линии и границ КК;

$\mathrm{Re}c_i$ – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i–го измерения пробы с добавкой тетрациклина, по формуле

$$\mathrm{Re}c_i = \frac{X_i}{X_{\text{exp}}} \cdot 100, \qquad (22)$$

где X_i – массовая концентрация антибиотиков группы тетрациклинов в пробе с добавкой, полученное для i–го измерения, мкг/кг;

X_{exp} – рассчитанное значение массовой концентрации антибиотиков группы тетрациклинов в пробе с добавкой, мкг/кг.

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 2 \cdot S_{REC}, \qquad (23)$$

- Границы регулирования

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 3 \cdot S_{REC} \qquad (24)$$

где S_{REC} – стандартное отклонение извлечения, %, рассчитываемое по формуле

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} \left(\overline{\mathrm{Re}c} - \mathrm{Re}c_i\right)^2}{N-1}} \qquad (25)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений X_i при выполнении испытаний ОК в соответствии с МВИ, расчета фактических значений коэффициента извлечения $\mathrm{Re}c_i$ по формуле (22), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [4], п. 7.

14 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

ГОСТ 8.010–99	Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 245-76	Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 4172-76	Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-водный. Технические условия
ГОСТ 4233-77	Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4328-77	Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 6341-75	Реактивы. Кислота янтарная. Технические условия
ГОСТ 6709 72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 6995-77	Реактивы. Метанол-яд. Технические условия
ГОСТ 11773-76	Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный. Технические условия
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 24104–2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой
ГОСТ 30364.0-97	Продукты яичные. Методы отбора проб и органолептического анализа
СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
СТБ ИСО 5725-2-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2 Основной метод измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-4-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4 Основные методы определения правильности стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике

Библиография

[1]	VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, V.J. Barwick and S.L.R. Ellison, LGC/VAM/1998/088
[2]	ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения
[3]	ТУ BY 100185129.149-2015 Тест система для определения антибиотиков группы тетрациклинов методом иммуноферментного анализа ПРОДОСКРИН Тетрациклин
[4]	ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта
[5]	ТУ 6-09-3375-78 н-Гексан

gost.e-ecolog.ru