СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке БелГИМ

_____ Г.А. Коломиец

«30» _____ 2015

УТВЕРЖДАЮ

Управляющий ОДО «КомПродСервис»

_____ Д.Ч. Кучинский

«___» _____ 2015

Методика выполнения измерений содержания хлорамфеникола (левомицетина) в продукции животного происхождения с использованием тест-систем RIDASCREEN®Chloramphenicol и ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол

МВИ.МН 2436-2015

(взамен МВИ.МН 2436-2013)

СОГЛАСОВАНО

Директор Института биоорганической химии НАН Беларуси

_____ А.И. Усанов

«___» _____ 2015

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 919 / 2015
об аттестации МВИ от 30.12.2015 г.

МИНСК 2015

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения **3**
2 Точность измерений **3**
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы **5**
3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы 5
3.2 Реактивы 7
4 Метод измерений **8**
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов **9**
5.1 Общие требования безопасности 9
5.2 Требования безопасности при работе с метанолом 9
5.3 Требования к квалификации операторов 9
6 Условия выполнения измерений **9**
7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении **9**
8 Условия хранения тест-систем **10**
9 Подготовка к выполнению измерений **10**
9.1 Отбор образцов 10
9.2 Подготовка лабораторной посуды 10
9.3 Приготовление растворов 10
9.4 Подготовка тест-систем 12
9.5 Подготовка проб 14
10 Выполнение измерений **23**
11 Обработка результатов измерения **24**
11.1 Расчет массовой концентрации 24
11.2 Определение массовой концентрации хлорамфеникола при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки 26
12 Контроль холостой пробы **26**
13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости **27**
14 Оформление результатов измерений **27**
14.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности 27
14.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием предела измерения 28
14.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием значения верхней границы диапазона измерений 28
15 Контроль точности результатов измерений **28**
15.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости. 28
15.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности 28
15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 29
15.4 Контроль правильности 30
15.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 31
16 Нормативные ссылки **33**
Библиография **34**

1 Область применения

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации хлорамфеникола (левомицетина) в указанной ниже продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем Ridascreen ® Chloramphenicol производства R-Biopharm AG, Германия или тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол, производства Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Настоящая методика распространяется на сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное и сгущенное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, творог, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, йогурт и другие кисломолочные продукты (сметана, кефир, пахта и т.п.), молочную сыворотку, восстановленную сухую молочную сыворотку, мясо (мышцы), готовые к употреблению мясные продукты, яйца, порошок яичный[1], мед при использовании обоих вышеуказанных тест-систем, а также на рыбу, продукты из рыбы, креветки, жиры животные, шпик, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные при использовании только тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол.

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

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Точность измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой концентрации хлорамфеникола в соответствии с областью применения, приведенной в разделе 1, в диапазоне измерений с показателями точности согласно таблице 1.

Для всех видов продукции в диапазоне измерений методики смещение незначимо.

Значения оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблице 2.

Указанные метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента, проведенного в соответствии с:

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

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

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
При использовании тест-систем Ridascreen ® Chloramphenicol и ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол			
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания (метод экстракции)	от 0,010 до 0,150 включ.	4,5	7,4
Сгущенное молоко	от 0,020 до 0,300 включ.		
Йогурт с наполнителями	от 0,100 до 0,750 включ.		
Йогурт без наполнителей и другие кисломолочные продукты, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 0,020 до 0,750 включ.		
Творог	от 0,100 до 1,500 включ.		
Масло сливочное[2]	от 0,130 до 5,025 включ.		
Сыр	от 0,025 до 0,750 включ.		
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты	от 0,013 до 0,750 включ.		
Яйца, яичный порошок	от 0,050 до 0,750 включ.		
Мед	от 0,075 до 0,750 включ.	3,1	4,0
При использовании только тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол			
Мороженое, коктейли молочные	от 0,010 до 0,300 включ.	4,5	7,4
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания (прямой метод)	от 0,025 до 0,750 включ.		
Рыба, продукты из рыбы, креветки, жиры животные, шпик, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные	от 0,013 до 0,750 включ.		

[2] Нижняя и верхняя границы диапазона измерений для масла сливочного зависят от его жирности и рассчитываются с учетом значения фактора разбавления, указанного в таблице 5, как (0,025×фактор разбавления) мкг/кг, (0,75×фактор разбавления) мкг/кг соответственно. Здесь и далее по тексту указаны минимальное значение предела измерений и максимальное значение верхней границы диапазона измерений

Таблица 2 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K = 2, P = 95$ %
При использовании тест-систем Ridascreen ® Chloramphenicol и ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол			
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания (метод экстракции)	от 0,010 до 0,150 включ.	10	20
Сгущенное молоко	от 0,020 до 0,300 включ.		
Йогурт с наполнителями	от 0,100 до 0,750 включ.		
Йогурт без наполнителей и другие кисломолочные продукты, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 0,020 до 0,750 включ.		
Творог	от 0,100 до 1,500 включ.		
Масло сливочное	от 0,130 до 5,025 включ.		
Сыр	от 0,025 до 0,750 включ.		
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты	от 0,013 до 0,750 включ.		
Яйца, яичный порошок	от 0,050 до 0,750 включ.		
Мед	от 0,075 до 0,750 включ.	6	12
При использовании только тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол			
Мороженое, коктейли молочные	от 0,010 до 0,300 включ.	10	20
Сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания (прямой метод)	от 0,025 до 0,750 включ.		
Рыба, продукты из рыбы, креветки, жиры животные, шпик, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные	от 0,013 до 0,750 включ.		

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 не менее 200 г, погрешностью ± 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.

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.

Система для выпаривания в токе азота, обеспечивающая поддержание температуры 60 °С ± 5 °С. Допускается проводить выпаривание в токе азота на водяной бане, обеспечивающей поддержание температуры 60 °С ± 5 °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 200 об/мин.

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

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

Лабораторный миксер, обеспечивающий скорость от 100 об/мин до 1200 об/мин, например IKA RW16 basic, производства IKA® Werke GmbH & Co. KG, (Германия). Допускается использовать бытовой погружной блендер с плавной регулировкой скорости или миксер со скоростью насадки в диапазоне от 200 об/мин до 2000 об/мин.

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 %.

Пленка «парафильм» или скотч.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Шпатели пластиковые.

Штатив для пробирок.

Пипетки Пастера.

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

Палочки стеклянные оплавленные.

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

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

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

Колбы мерные вместимостью 100 $см^3$, 500 $см^3$, 1000 $см^3$ типа 2–100–2, 2–500–2, 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-фильтры или шприцы и фильтрующие насадки 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.

Этилацетат ч.д.а. по ГОСТ 22300.

н-Гексан ч. по [4].

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Хлорамфеникол, каталожный номер SIGMA C0378, массовая доля основного вещества не менее 98 %.

Цинк сернокислый семиводный х.ч. по ГОСТ 4174.

Калий железистосинеродистый 3-водный ч.д.а. по ГОСТ 4207.

Натрия фосфат двуосновной дигидрат ($Na_2HP0_4 \cdot 2H_2O$), каталожный номер Fluka 71645 или натрий фосфорнокислый двузамещенный, 12-водный ($Na_2HP0_4 \cdot 12H_2O$) ч.д.а по ГОСТ 4172.

Натрия фосфат одноосновной моногидрат ($NaH_2P0_4 \cdot H_2O$), каталожный номер Sigma-Aldrich 71504 или натрий фосфорнокислый однозамещенный, 2-водный ($NaH_2P0_4 \cdot 2H_2O$) ч.д.а по ГОСТ 245.

Натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233.

Натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328.

Азот газообразный повышенной чистоты по ГОСТ 9293.

Тест-системы Ridascreen ® Chloramphenicol (артикульный № R1505) производства R-Biopharm AG, Германия или тест-системы ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол, производства Института биоорганической химии НАН Беларуси, арт. № 147 по [3] – набор реактивов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению содержания хлорамфеникола методом иммуноферментного анализа в составе (таблицы 3, 4).

Таблица 3 – Состав тест-системы Ridascreen ® Chloramphenicol

Компонент тест-системы	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к хлорамфениколу)	1 шт
Градуировочные растворы хлорамфеникола с концентрацией 0 нг/дм^3, 25 нг/дм^3, 50 нг/дм^3, 100 нг/дм^3, 250 нг/дм^3, 750 нг/дм^3	6 шт. × 1,3 см^3
Концентрат конъюгата хлорамфеникола с пероксидазой	1 шт. × 0,7 см^3
Субстрат/хромоген, раствор, окрашенный в красный цвет	1 шт. × 10 см^3
Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту	1 шт. × 14 см^3
Буфер, готовый к применению, используется для разбавления концентрата конъюгата и растворов проб	1 шт. × 100 см^3
Моющий буфер, соль для приготовления 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), содержит 0,05 % твина-20	1 уп.

Таблица 4 – Состав тест-системы ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол

Компонент тест-системы	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к хлорамфениколу)	1 шт
Градуировочные растворы хлорамфеникола с концентрацией 0 нг/дм^3, 25 нг/дм^3, 50 нг/дм^3, 100 нг/дм^3, 250 нг/дм^3, 750 нг/дм^3	6 шт. × 1,3 см^3
Концентрат конъюгата хлорамфеникола с пероксидазой хрена	1 шт. × 0,7 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, готовый к применению, используется для разбавления концентрата конъюгата и растворов проб	1 шт. × 100 см^3
Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1 шт. × 100 см^3

Примечание: в состав тест-системы ПРОДОСКРИН® Хлорамфеникол 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 (хлорамфеникола) с антителами. В лунки микротитровального планшета, покрытого антителами к хлорамфениколу, добавляются градуировочные растворы хлорамфеникола или растворы проб вместе с раствором конъюгата хлорамфеникола с ферментом. Хлорамфеникол, присутствующий в градуировочных растворах или пробах, и хлорамфеникол, коньюгированный с ферментом, конкурируют за центры связывания антител. Затем несвязанный конъюгат фермента удаляется на стадии промывки. После добавления раствора(ов) субстрата/хромогена связанный конъюгат фермента превращает хромоген в голубой продукт. Реакция окрашивания останавливается после

добавления стоп-реагента, который меняет цвет раствора на желтый.

Измеренная при 450 нм оптическая плотность обратно пропорциональна массовой концентрации хлорамфеникола в растворе. Массовая концентрация хлорамфеникола 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 хлорамфеникола 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. 9.5 замороженные образцы должны быть разморожены 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 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.

9.3.2 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.

9.3.3 Приготовление реактива Карреза I с молярной концентрацией $K_4\left[Fe(CN)_6\right]$ 0,36 моль/$дм^3$

В стакан вместимостью 100 $см^3$ вносят навеску 7,6 г калия железистосинеродистого 3-водного, взвешенного с точностью до 0,1 г, затем добавляют 26 $см^3$ - 36 $см^3$ дистиллированной воды. После растворения навески раствор из стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, доводят объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 7 дней.

9.3.4 Приготовление реактива Карреза II с молярной концентрацией $ZnSO_4$ 1,04 моль/$дм^3$

В стакан вместимостью 100 $см^3$ вносят навеску 15,0 г цинка сернокислого 7-водного, взвешенную с точностью до 0,1 г, затем добавляют 26 $см^3$ – 36 $см^3$ дистиллированной воды. После растворения навески раствор из стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, доводят объем до метки дистиллированной водой. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 7 дней.

9.3.5 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.

9.3.6 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. 9.3.5. pH раствора проверяют с помощью

pH-метра. Раствор хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С не более 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 субстрата/хромогена (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_w. 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 - исследуемые пробы,

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

А, В, ... Н - обозначения лунок в стрипах.

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

9.4.3 Приготовление моющего буфера

При использовании тест-систем Ridascreen ® Chloramphenicol 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 небольшое 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®Хлорамфеникол 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.

9.4.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Концентрат конъюгата подготавливают по п. 9.4.1 и перемешивают непосредственно перед приготовлением рабочего раствора конъюгата.

В пробирку вместимостью 5 см^3 добавляют отмеренные дозатором буфер для разбавления концентрата конъюгата и растворов проб объемом $V_б$, мм^3, и аликвоту концентрата конъюгата хлорамфеникола объемом $V_а$, мм^3. Содержимое пробирки тщательно перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены. Концентрат конъюгата сразу же убирают в холодильник и хранят в соответствии с п. 8.

Требуемый объем концентрата конъюгата и буфера для разбавления рассчитывают по формулам

$$\begin{aligned} V_а &= 5 \cdot N_W + 0{,}1 \cdot A \\ V_б &= 10 \cdot V_а \end{aligned} \quad , \qquad (2)$$

где N_w – количество лунок, используемых в анализе, определяется согласно п. 9.4.2;

A – объем рабочего раствора конъюгата, приготавливаемого в запас, мм^3 (не менее 200 мм^3).

Примечание: рабочий раствор конъюгата готовится не более чем за 15 мин до выполнения ИФА.

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

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 или стекла 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 действия 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_w, по формуле

$$V = \frac{0.1 \cdot N_w + V_1}{21}, \qquad (3)$$

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 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 2,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см^3. В каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 12 см^3 этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 6 см^3, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 10 см^3.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 1 $см^3$, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 1 $см^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$.

Центрифугируют пробы в следующем режиме: от 20 °С до 25 °С, 3000 g, 10 мин.

После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой.

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.

9.5.2 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. С готовых к употреблению мясных продуктов удаляют оболочку и поверхностный слой. Образцы 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 пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 3 $см^3$ дистиллированной воды и 6 $см^3$ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 $см^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 1 $см^3$, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 0,5 $см^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$.

Центрифугируют пробы в следующем режиме: от 20 °С до 25 °С, 3000 g, 10 мин.

После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой.

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.

9.5.3 Подготовка проб рыбы, креветок, продуктов из рыбы, жиров животных, шпика, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных (только при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол)

Подготовку проб рыбы, креветок, продуктов из рыбы, жиров животных, шпика, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных проводят по п. 9.5.2.

9.5.4 Подготовка 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. 9.3.1. Смесь гомогенизируют с помощью лабораторного миксера, не допуская ее разбрызгивания.

Переносят гомогенизированную смесь в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$ и выдерживают ее на водяной бане при температуре от 40 °С до 45 °С в течение 10 мин. За это время смесь перемешивают три раза, энергично встряхивая пробирку.

Пробирки помещают на лед и выдерживают в течение 15 мин. После этого проводят центрифугирование при температуре 4 ^{0}С, 3000 g, в течение 15 мин.

Переносят дозатором 4,8 $см^3$ водного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$, добавляют отмеренные дозатором 8 $см^3$ этилацетата и интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин.

Центрифугируют пробирки при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

Отбирают дозатором 4 $см^3$ органического слоя (этилацетат) и переносят в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 1 $см^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

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.

9.5.5 Подготовка 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 °С ± 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 20 с. Добавляют в пробирки отмеренный дозатором 1 $см^3$ раствора метанола (2:8 по объему), приготовленного по п. 9.3.2. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе в течение 20 с, после чего продолжают перемешивание на шейкере или 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 20 с. Повторяют центрифугирование при 4 °С, 2000 g, в течение 10 мин, после чего осторожно удаляют верхний гексановый слой пипеткой Пастера.

700 $мм^3$ водного слоя переносят дозатором в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$. Пробирки помещают на лед и выдерживают в течение 10 мин. После этого проводят центрифугирование при температуре от 20 ^{0}С до 25 ^{0}С, 20000 g, в течение 5 мин. При отсутствии центрифуги, обеспечивающей вышеуказанный режим, вместо центрифугирования проводят фильтрование через шприц-фильтр.

Отбирают дозатором 200 $мм^3$ водной фазы и переносят в стеклянную пробирку вместимостью 5 $см^3$. Затем в пробирку дозатором добавляют 700 $мм^3$ буфера для разбавления 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.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.5.6 Подготовка проб молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания (метод экстракции)

9.5.6.1 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 $см^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Восстановление проб сухих молочных смесей для детского питания производят

по приведенной выше схеме, используя отношение массы смеси к объему воды, указанное в инструкции производителя.

9.5.6.2 Получение подготовленных проб сырого, пастеризованного, стерилизованного и восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания

Доводят температуру образца сырого, пастеризованного, стерилизованного молока, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего образец перемешивают путем встряхивания и переворачивания упаковки. Перед отбором аликвоты образец 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, пастеризованного, стерилизованного молока, подготовленного, как описано выше, или восстановленных согласно п. 9.5.6.1 сухого молока или сухих молочных смесей для детского питания с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 10 $см^3$ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. В пробирки добавляют отобранные дозатором 500 $мм^3$ реактива Карреза I, приготовленного по п. 9.3.3 и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее в пробирки добавляют отобранные дозатором 500 $мм^3$ реактива Карреза II, приготовленного по п. 9.3.4, перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4 °С, 3000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая пробы молока до температуры от плюс 2 °С до плюс 4 °С, контролируя температуру термометром.

Дозатором переносят 4,4 $см^3$ надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 $см^3$ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 $см^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 400 $мм^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

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.

9.5.6.3 Получение подготовленных проб 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.

От образца отбирают две параллельные навески массой 5,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. В пробирки добавляют отобранные дозатором 5 $см^3$ дистиллированной воды и перемешивают до образования однородной смеси.

Затем в пробирки добавляют отобранные дозатором 500 $мм^3$ реактива Карреза I, приготовленного по п. 9.3.3 и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее в пробирки добавляют отобранные дозатором 500 $мм^3$ реактива Карреза II, приготовленного по п. 9.3.4, перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4 °С, 3000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 2 °С до плюс 4 °С, контролируя температуру термометром.

Дозатором переносят 4 $см^3$ надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 $см^3$ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 $см^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 400 $мм^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

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.

9.5.7 Подготовка проб молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания (прямой метод, только при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол)

Доводят температуру образца сырого, пастеризованного, стерилизованного молока, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего образец перемешивают путем встряхивания и перевораживания упаковки. Перед отбором аликвоты образец 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. 9.5.6.1, с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы 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 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.

9.5.8 Подготовка проб мороженого, коктейлей молочных (только при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол)

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с п. 9.1. От образца предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Температуру образца доводят от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Образцы коктейлей молочных перемешивают путем встряхивания и переворачивания упаковки.

От образца, подготовленного как описано выше, отбирают две параллельные навески массой 10,0 г и далее проводят подготовку проб согласно п. 9.5.6.2.

9.5.9 Подготовка проб йогурта и других кисломолочных продуктов, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки

9.5.9.1 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 и тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 100 $см^3$ или 150 $см^3$ помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с точностью до 0,01 г.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5 – 10 $см^3$ приливают дистиллированную воду, 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.

9.5.9.2 Получение подготовленных проб

Доводят температуру образца йогурта или других кисломолочных продуктов, молочной сыворотки, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего перемешивают. При наличии в образце йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают

От образца йогурта или других кисломолочных продуктов, молочной сыворотки, подготовленного, как описано выше, или восстановленной согласно п. 9.5.9.1 сухой молочной сыворотки отбирают две параллельные навески массой

10,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$. В пробирки добавляют отобранные дозатором 8 $см^3$ 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 9.3.6, и перемешивают содержимое.

Затем в пробирки добавляют отобранные дозатором 1 $см^3$ реактива Карреза I, приготовленного по п. 9.3.3 и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее в пробирки добавляют отобранные дозатором 1 $см^3$ реактива Карреза II, приготовленного по п. 9.3.4, перемешивают при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин и центрифугируют в следующем режиме: 10 °С, 4000 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.

Дозатором переносят 4 $см^3$ надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$ и добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 $см^3$ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 $см^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 400 $мм^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

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.

9.5.10 Подготовка проб творога, творожных продуктов

От образца предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. 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 перемешивают.

От образца отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$. В пробирки добавляют отобранные дозатором 16 $см^3$ 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 9.3.6, и 1 $см^3$ реактива Карреза I, приготовленного по п. 9.3.3, и тщательно перемешивают содержимое пробирок.

Далее в пробирки добавляют отобранные дозатором 1 $см^3$ реактива Карреза II, приготовленного по п. 9.3.4, перемешивают при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4 °С, 3000 g, 15 мин.

Дозатором переносят 4 $см^3$ надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$ и добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 $см^3$ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение

10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 $см^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 400 $мм^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

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.

9.5.11 Подготовка проб меда

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 перемешивают.

От образца отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$. В пробирки добавляют отобранные дозатором 4 $см^3$ дистиллированной воды и тщательно перемешивают содержимое пробирок до растворения навески меда.

Далее в пробирки добавляют отобранные или пипеткой 4 $см^3$ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 1 $см^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 500 $мм^3$ и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

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.

9.5.12 Получение разбавленных растворов проб

При получении для проб видов продукции, соответствующих №1, №3, №11, №12, №13 таблицы 5, результатов измерений больших, чем значение, соответствующее верхней границе диапазона градуировки (750 $нг/дм^3$), согласно п. 11 проводят разбавление приготовленных по п. 9.5 растворов проб буфером для разбавления проб. Разбавлению должны подвергаться свежеприготовленные растворы проб.

При проведении разбавления отобранные дозатором аликвоты растворов проб объемом V_a, $мм^3$, переносят в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$. В

пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом $V_б$, мм^3, и перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Коэффициент разбавления K рассчитывается по формуле

$$K = \frac{V_а + V_б}{V_а} \quad (4)$$

Величины $V_а$, $V_б$ должны соответствовать условию (5), и выбираются таким образом, чтобы концентрация хлорамфеникола в разбавленном растворе пробы находилась в диапазоне градуировки.

$$500 \le (V_б + V_а) \le 1000 \quad (5)$$

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

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

10 Выполнение измерений

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.5. Компоненты тест-систем подготавливают в соответствии с п. 9.4.

10.1 В лунки микротитровального планшета, размещенного 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; 25; 50; 100; 250; 750 пг/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 рабочего раствора конъюгата, приготовленного по п. 9.4.4. 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. 9.4.3, 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 планшета дозатором вносят по 100 мм^3 раствора субстрата/хромогена. 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. 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.

10.9 Сразу же после окончания инкубации в каждую лунку планшета дозатором вносят по 100 мм^3 раствора стоп-реагента и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают его содержимое.

10.10 В течение 30 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

11.1 Расчет массовой концентрации

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 указанным программным обеспечением.

Программное обеспечение автоматически осуществляет:

- построение градуировочной зависимости концентрация – относительная оптическая плотность ($100B_i/B_0$), где B_i – оптическая плотность i –го градуировочного раствора ($i = 2..6$), B_0 – оптическая плотность 1–го градуировочного раствора с концентрацией 0 нг/дм^3 хлорамфеникола;
- расчет фактического значения массовой концентрации хлорамфеникола в пробах x, нг/кг, 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 5;
- количество параллельных определений образца (Samples→Replicates) – 1;
- количество параллельных определений градуировочного раствора (Standards→Replicates) – 2.

Таблица 5 – **Факторы разбавления**

№ пп.	Виды продукции	Значения фактора разбавления
1	Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания (метод экстракции)	0,2
2	Сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания (прямой метод, только при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол)	1
3	Йогурт, кисломолочные продукты, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка и сгущенное молоко	0,4
4	Творог, творожные продукты	2
5	Масло сливочное 50 % жирности	6,7
6	Масло сливочное 65 %, 67 % жирности	6
7	Масло сливочное 70 % жирности	5,7
8	Масло сливочное 72,5 %, 75 %, 78 % жирности	5,5
9	Масло сливочное 82,5 %, 84 % жирности	5,2
10	Сыр, яйца, яичный порошок, мед	1
11	Мясо, готовые к употреблению мясные продукты	0,25
12	Рыба, креветки, продукты из рыбы, жиры животные, шпик, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные (только при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол)	0,25
13	Мороженое, коктейли молочные (только при использовании тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол)	0,2

Если при использовании тест-систем Ridascreen ® Chloramphenicol в результате проведения контроля холостой пробы согласно п. 12, условие (10) не выполняется, то для расчета массовой концентрации хлорамфеникола в пробе применяется следующая формула

$$X = 0,001 \cdot x - X_{BL}, \quad (6)$$

где X_{BL} – концентрация хлорамфеникола в холостой пробе, мкг/кг, определяемая согласно п. 12.

Во всех остальных случаях массовая концентрация хлорамфеникола в пробе X, мкг/кг, рассчитывается по формуле

$$X = 0,001 \cdot x, \quad (7)$$

где x – концентрация хлорамфеникола в пробе, полученная при помощи программного обеспечения, нг/кг.

Для проб видов продукции, соответствующих №1, №3, №11, №12, №13 таблицы 5, при получении результатов измерений выше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки (750 нг/дм), выполняются действия согласно п. 11.2.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 13

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (8)$$

где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой концентрации хлорамфеникола в параллельных пробах, мкг/кг, рассчитанные, как описано выше.

Окончательный результат измерений округляют до третьего десятичного знака.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ}, приведенный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием предела измерения согласно п. 14.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, приведенное в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 14.3.

Примечание: для проб яичного порошка получаемый в соответствии с данной методикой результат измерения массовой концентрации хлорамфеникола относится к восстановленному согласно ГОСТ 30364.0 продукту (см. п. 9.5.1).

11.2 Определение массовой концентрации хлорамфеникола при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки

При получении в пробах видов продукции, соответствующих №1, №3, №11, №12, №13 таблицы 5, результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки, проводят разбавление растворов проб согласно п. 9.5.12.

В этом случае при обработке результатов измерений массовой концентрации хлорамфеникола в вышеупомянутых пробах согласно п. 11.1 для разбавленных растворов проб в настройках программного обеспечения в качестве фактора разбавления задается произведение фактора разбавления согласно таблице 5 на коэффициент разбавления, рассчитанный по формуле (4)

$$Фактор\ разбавления = 0{,}25 \cdot K \quad (9)$$

12 Контроль холостой пробы

Для контроля чистоты реактивов и посуды проводят анализ холостой пробы.

Для этого выполняют процедуру подготовки пробы согласно п. 9.5, используя вместо навески пробы равное количество дистиллированной воды. Проводят подготовку и измерение двух параллельных холостых проб. Рассчитывают массовую концентрацию хлорамфеникола в холостой пробе X_{BL}, мкг/кг по формулам (7), (8) (п. 11).

Если полученное значение массовой концентрации хлорамфеникола в холостой пробе удовлетворяет условию

$$X_{BL} \le 0{,}025 \cdot F, \quad (10)$$

где F – фактор разбавления, определяемый в соответствии с разделом 11,

то массовую концентрацию хлорамфеникола в холостой пробе при расчете не учитывают (расчет массовой концентрации хлорамфеникола в испытуемых пробах ведут по формуле (7)). При невыполнении условия (10) массовую концентрацию хлорамфеникола в холостой пробе при расчете учитывают (расчет массовой

концентрации хлорамфеникола в испытуемых пробах ведут по формуле (6)).

Контроль холостой пробы выполняют каждый раз при замене реактивов и посуды.

13 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

$$|X_1 - X_2| \le r_{abs}, \quad (11)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\overline{X}$, рассчитанное по формуле (8).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \overline{X}, \quad (12)$$

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

r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 6, %.

При невыполнении условия (11) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

14 Оформление результатов измерений

14.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

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

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

где $\overline{X}$ – 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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \overline{X}, \quad (13)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с МВИ, %, приведенная в таблице 2.

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

14.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием предела измерения

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

$$менее\ X_{LQ},$$

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

14.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием значения верхней границы диапазона измерений

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

$$более\ X_{HL},$$

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

15 Контроль точности результатов измерений

Контроль точности результатов 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.

15.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации хлорамфеникола при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 13.

15.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, 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. 13. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\overline{X_1}, \overline{X_2}$

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X_1} + \overline{X_2}}{2}, \quad (14)$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$\left|\overline{X_1} - \overline{X_2}\right| \leq \mathrm{CD}_{\text{абс}}, \quad (15)$$

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

$$CD_{абс} = 0{,}01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \quad (16)$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 6, %.

15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, 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. 13.

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

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2} \quad (17)$$

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

$$\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| \leq CD_R, \quad (18)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (17), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности CD_R, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$CD_R = 0{,}01 \cdot k \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \quad (19)$$

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

k – коэффициент, равный 1,8 для меда и 1,3 для остальных видов продукции;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 6.

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

Таблица 6 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн.}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное, сгущенное), восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, йогурт и другие кисломолочные продукты, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, творог, масло сливочное, сыр, мясо, готовые к употреблению мясные продукты, яйца, яичный порошок	13	19	17
Мороженое, коктейли молочные, рыба, продукты из рыбы, креветки, жиры животные, шпик, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные (при использовании только тест-систем ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол)	13	19	17
Мед	9	10	14

15.4 Контроль правильности

Контроль правильности при определении массовой концентрации хлорамфеникола производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением концентрации вещества (рабочая проба с добавкой).

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

15.4.1 ОК, представляющим собой рабочие пробы с добавкой

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

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \qquad (20)$$

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

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

m – масса навески пробы, г.

Величина массовой концентрации хлорамфеникола в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из хлорамфеникола в соответствии с рекомендациями производителя. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы) хлорамфеникола, при условии что относительная стандартная неопределенность концентрации хлорамфеникола в них не превышает 3 %.

15.4.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой концентрации хлорамфеникола $\overline{X_K}$ в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (17) при выполнении условия повторяемости по п. 13.

Критерием приемлемости является условие

$$\left|\overline{X_K} - X_{am}\right| \le 0{,}01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{X_K}, \qquad (21)$$

где $K_{отн.}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 6;

X_{am} – рассчитанное значение массовой концентрации хлорамфеникола в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (21) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

15.5 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 [5] 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 хлорамфеникола, приготовленного из хлорамфеникола в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы) хлорамфеникола, при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации хлорамфеникола в них не превышает 3 %.

Предварительно установленная массовая концентрация хлорамфеникола в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку хлорамфеникола в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

15.5.1 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

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1{,}128 \cdot \sigma_r, \tag{22}$$

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2{,}834 \cdot \sigma_r \tag{23}$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3{,}686 \cdot \sigma_r \tag{24}$$

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 (25), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \tag{25}$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5], п. 7.

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формулам (25), (26)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^{N} W_i \Big/ N}{d_2}, \tag{26}$$

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.

15.5.2 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

$$\overline{\mathrm{Re}c} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Re}c_i}{N}, \tag{27}$$

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 хлорамфеникола, по формуле

$$\mathrm{Re}c_i = \frac{X_i}{X_{\text{exp}}} \cdot 100, \qquad (28)$$

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

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 2 \cdot S_{REC}, \qquad (29)$$

- Границы регулирования

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 3 \cdot S_{REC} \qquad (30)$$

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

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}\left(\overline{\mathrm{Re}c} - \mathrm{Re}c_i\right)^2}{N-1}} \qquad (31)$$

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 (28), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5], п. 7.

16 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 4174-77	Цинк сернокислый семиводный. Технические условия
ГОСТ 4207-75	Реактивы. Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия
ГОСТ 4233-77	Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4328-77	Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 6995-77	Реактивы. Метанол-яд. Технические условия
ГОСТ 9293-74	Азот газообразный и жидкий. Технические условия
ГОСТ 11773-76	Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный. Технические условия
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 22300–76	Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. 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 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
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 5725-6-2002	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 100185129.147-2015 Тест-система для определения хлорамфеникола методом иммуноферментного анализа «ПРОДОСКРИН®Хлорамфеникол»
[4]	ТУ 6-09-3375-78 н-Гексан
[5]	ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта

gost.e-ecolog.ru