

**Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии»
(БелГИМ)**

**СВИДЕТЕЛЬСТВО
о признании аттестованной методики (метода) измерений**

№ 142/2026 от «06» февраля 2026 г.

Методика (метод) измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® в продукции животного происхождения (свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 1313/03-RA.RU.311703-2024 от 10.12.2024),

разработанная ООО «СпектрПродукт», Российская Федерация,

почтовый адрес: 214000, Смоленская область, г. Смоленск, ул. Ленина, д. 13а, помещение 17,

установленная в ФР.1.31.2025.50186 «Продукция животного происхождения. Методика измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal®» (МИ 1016-Т-2024) с изменением № 1,

аттестованная ФБУ «НИЦ ПМ – РОСТЕСТ», почтовый адрес: Российская Федерация, 117418, г. Москва, проспект Нахимовский, д. 31,

признана в Республике Беларусь в соответствии с правилами по межгосударственной стандартизации ПМГ 44-2001 «Порядок признания методик выполнения измерений» по результатам экспертизы в БелГИМ (в соответствии с поручением Госстандарта от 03.02.2026 № 04-06/120).

Заместитель директора



М.П.

Ю.С.Иванов

Дата выдачи свидетельства о признании
аттестованной методики (метода) измерений:

«06» февраля 2026 г.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«СПЕКТРПРОДУКТ»
ООО «СпектрПродукт»



Генеральный директор
ООО «СпектрПродукт»

А.Д. Юревич

2024 г

ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ
ТЕТРАЦИКЛИНОВ МЕТОДОМ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ MAXSIGNAL®
МИ 1016-Т-2024



Экземпляр № 1

Передан ООО «ПионерПродукт»

Смоленск
2024



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МЕТРОЛОГИИ - РОСТЕСТ»
(ФБУ «НИЦ ПМ-РОСТЕСТ»)

RA.RU.311703

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ

методики (метода) измерений
№ 1313/03-RA.RU.311703-2024

массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов методом ИФА с использованием
наборов реагентов MaxSignal®

при необходимости указывают объект и метод измерения

разработанной ООО «СпектрПродукт», 214000, Смоленская область, г Смоленск, ул Ленина,
д. 13а, помещение 17, тел: +7 911 352 90 95, e-mail: info@spektrprodukt.ru

наименование и адрес разработчика методики

регламентированной в документе «Продукция животного происхождения. Методика
измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов методом ИФА с
использованием наборов реагентов MaxSignal®» МИ 1016-Т-2024 утвержденном в декабре
2024 года на 38 страницах

обозначение и наименование документа, содержащего методику измерений, год его утверждения и число страниц

Методика (метод) измерений аттестована в соответствии с: Приказом Министерства
промышленности и торговли Российской Федерации от 15 декабря 2015 г. № 4091
«Об утверждении Порядка аттестации первичных референтных методик (методов)
измерений, референтных методик (методов) измерений и методик (методов) измерений и их
применения».

обозначение и наименование нормативного правового документа, на соответствие которого аттестована методика
измерений

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы проекта методики
измерений и результатов экспериментальных и теоретических исследований показателей
точности методики измерений.

вид работ: метрологическая экспертиза материалов по разработке методики измерений, теоретическое
или экспериментальное исследование методики измерений, другие виды работ

В результате аттестации методики измерений установлено, что методика измерений
соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими
показателями точности в соответствии с Приложением А настоящего свидетельства.

диапазон измерений, характеристики погрешности измерений (неопределенность измерений) и (или) характеристики
составляющих погрешности (при необходимости нормативы контроля)

Заместитель генерального директора
ФБУ «НИЦ ПМ-РОСТЕСТ»



«10» декабря 2024

М.П.

А.Д. Меньшиков

Приложение А
(обязательное)

**Показатели точности методики (метода) измерений массовой доли антибиотиков
группы тетрациклинов методом ИФА с использованием наборов реагентов
MaxSignal®**

Таблица 1 – Рабочие характеристики и показатели точности измерений

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относи- тельное стандартное отклонение повтора- емости σ_r , %	Относи- тельное стандартное отклонение промежу- точной прецизион- ности $\sigma_{(10)}$, %	Относи- тельная стандартная неопреде- ленность u , %	Относи- тельная расширенная неопреде- ленность U , %, $k=2$, $P=95$ %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 0,60 до 12,8 включ.	4,3	5,3	6	12
Молоко сухое	от 6,00 до 128 включ.	4,5	6,4	7	14
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 0,60 до 12,8 включ.	2,1	5,2	7	14
Масло сливочное, сыр, яйца, яичный порошок	от 3,00 до 32,0 включ.	3,2	5,6	7	14
Творог, творожные продукты, мороженое, сгущенное молоко	от 3,00 до 32,0 включ.	4,0	5,4	6	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы	от 1,50 до 16,0 включ.	5,2	8,3	9	18
Мед	от 3,00 до 32,0 включ.	3,3	5,3	6	12
Йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, коктейли на молочной основе	от 0,60 до 12,8 включ.	5,7	7,4	8	16

Заместитель директора Менделеевского филиала
ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест»



А.А. Марутин

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«СПЕКТРПРОДУКТ»
ООО «СпектрПродукт»



Генеральный директор
ООО «СпектрПродукт»

А.Д. Юревич

«10» ноября 2025 г.

Извещение об изменении № 1

ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ
ТЕТРАЦИКЛИНОВ МЕТОДОМ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ MAXSIGNAL®
МИ 1016-Т-2024



Экземпляр № 1



Передан ООО «ПионерПродукт»

Смоленск
2025

ООО «СпектрПродукт»		ИЗВЕЩЕНИЕ № 1		ОБОЗНАЧЕНИЕ ДОКУМЕНТА МИ 1016-Т-2024	
Дата выпуска		Срок изменения		Лист 2	Листов 2
ПРИЧИНА		Актуализация информации в части нормативных ссылок. Внесены изменения, не влияющие на показатели точности			Код -
УКАЗАНИЕ О ЗАДЕЛЕ					
УКАЗАНИЕ О ВНЕДРЕНИИ					
ПРИМЕНЯЕМОСТЬ					
РАЗОСЛАТЬ		Всем абонентам			
ПРИЛОЖЕНИЕ		На 38 листах			
ИЗМ.	СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ				
1	Листы 2 - 38 заменить.				
Составил					
Проверил				Н.контр.	
Изменение внес					



Предисловие

1 РАЗРАБОТАНА Обществом с ограниченной ответственностью «СпектрПродукт» (ООО «СпектрПродукт») (214000, Смоленская область, г. Смоленск, ул. Ленина, д. 13а, помещение 17, тел: +7 911 352 90 95, e-mail: info@spektrprodukt.ru)

2 АТТЕСТОВАНА Федеральным бюджетным учреждением «Научно-исследовательский центр прикладной метрологии – Ростест» (ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест») (117418, г. Москва, Нахимовский пр-кт, д. 31, тел. (495) 544-00-00, info@rostest.ru).

3 УТВЕРЖДЕНА «02» декабря 2024 г. Генеральным директором ООО «СпектрПродукт» А.Д. Юревичем

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «10» декабря 2024 г. № 1313/03-RA.RU.311703-2024, выдано ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ ФР.1.31.2025.50186

ВНЕСЕНЫ ИЗМЕНЕНИЯ № 1 «09» сентября 2025 г.

НАЧАЛО ДЕЙСТВИЯ ИЗМЕНЕНИЯ № 1 «01» декабря 2025 г.



Содержание

1 Вводная часть	5
1.1 Назначение и область применения методики измерений	5
2 Нормативные ссылки	6
3 Требования к показателям точности измерений	7
4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам	9
5 Метод измерений	12
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды и к квалификации персонала, выполняющего измерения	13
6.1 Требования безопасности, охраны окружающей среды	13
6.2 Требования к квалификации персонала, выполняющего измерения	13
7 Требования к условиям измерений	13
8 Требования к условиям инкубации микротитровальных планшетов в помещении	13
9 Требования к условиям хранения набора реагентов	14
10 Подготовка к выполнению измерений	14
10.1 Подготовка лабораторной посуды	14
10.2 Приготовление растворов	14
10.2.1 Приготовление раствора гидроокиси натрия массовой долей 30 %	14
10.2.2 Приготовление 10 мМ фосфатно-солевого буфера	14
10.2.3 Приготовление экстракционного ОХТЕТ-буфера	15
10.2.4 Приготовление раствора NaOH молярной концентрацией 1 моль/дм ³	15
10.2.5 Приготовление раствора HCl молярной концентрацией 1 моль/дм ³	16
10.2.6 Приготовление промывочного раствора	16
10.3 Подготовка набора реагентов	16
10.3.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов	16
10.3.2 Подготовка микротитровального планшета	16
10.3.3 Приготовление основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/см ³	17
10.3.5 Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2	18
10.4 Требования к отбору образцов	18
10.5 Хранение образцов	18
10.6 Подготовка проб	19
10.6.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, ультрапастеризованного молока, сливок	19
10.6.2 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны, варенца, простокваши, ряженки, айрана, пахты, ацидофилина и других кисломолочных продуктов, коктейлей на молочной основе	19
10.6.3 Подготовка проб сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания	20
10.6.4 Подготовка проб меда	21
10.6.5 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, рыбных консервов и пресервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы, креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров животных	21
10.6.6 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога, творожных продуктов, мороженого, сгущенного молока, яиц, яичного порошка	22
10.6.7 Получение растворов проб молока, молока сухого, сливок, молочных смесей для детского питания, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны и других кисломолочных продуктов, коктейлей на молочной основе с фактором разбавления, увеличенным по сравнению с указанным в инструкции к набору реагентов	23
11 Выполнение измерений	23
11.1 Общие требования	23
11.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно	23



11.3 Процедура измерений	23
11.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб	23
11.3.2 Добавление раствора антител	24
11.3.3 Инкубация	24
11.3.4 Промывка планшета	24
11.3.5 Добавление раствора конъюгата	24
11.3.6 Инкубация	24
11.3.7 Промывка планшета	25
11.3.8 Добавление ТМБ субстрата	25
11.3.9 Инкубация	25
11.3.10 Завершение реакции окрашивания	25
11.3.11 Измерение оптической плотности	25
12 Порядок обработки результатов измерений	25
12.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в пробах	25
12.2 Действия при получении результата измерений оптической плотности проб меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с максимальной массовой концентрацией	27
12.3 Расчет окончательного результата измерений	27
13 Форма представления результатов измерений	28
13.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности	28
13.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли	28
14 Контроль точности результатов измерений	29
14.1 Периодичность проведения контроля точности	29
14.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	29
14.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	30
14.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости	30
14.5 Контроль правильности	32
14.5.1 Образцы для контроля правильности	32
14.5.2 Проведение контрольной процедуры	33
14.6 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)	34
14.6.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости	34
14.6.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности	35
Библиография	37
Приложение А	38



1 Вводная часть

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов (тетрациклина, хлортетрациклина, доксициклина, ролитетрациклина, демеклоциклина, окситетрациклина, 4-эпитетрациклина, 4-эпихлортетрациклина, 4-эпиокситетрациклина)* в указанной ниже продукции животного происхождения, в том числе сырье, методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов MaxSignal® для определения тетрациклина, далее набор реагентов.

Область применения методики включает в себя следующие виды продукции: молоко (сырое, пастеризованное, ультрапастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, сливки, масло сливочное, сыр, йогурт, кефир, сметану и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочную сыворотку, сухую молочную сыворотку, коктейли на молочной основе, мороженое, сгущенное молоко, мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, рыбу, рыбную продукцию, креветки, икру, яйца, яичный порошок, мед и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания антибиотиков группы тетрациклинов.

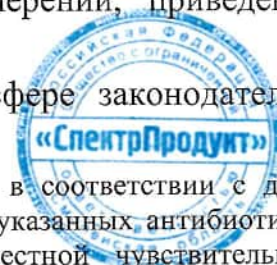
Результаты измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов, полученные согласно настоящей методике для сухих продуктов переработки молока и яиц, относятся:

- в сухой молочной сыворотке – к продукции, восстановленной согласно методике;
- в сухой молочной смеси для детского питания – к продукции, восстановленной согласно инструкции по применению ее изготовителя;
- в яичном порошке – к продукции, восстановленной согласно ГОСТ 30364.0.

Диапазон измерений методики, а также предел измерений, определяемый как нижняя граница диапазона измерений, приведены в разделе 2, таблицы 1.

Настоящая методика может применяться в сфере законодательной

*Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в соответствии с данной методикой определяется как сумма значений массовой доли указанных антибиотиков и эпимеров в пересчете на тетрациклин с учетом перекрестной чувствительности, специфицируемой изготовителем набора реагентов.



метрологии, а также вне нее, в том числе в следующих областях:

- обеспечение защиты жизни и охраны здоровья человека;
- проведение испытаний и осуществление контроля за соответствием продукции и сырья требованиям законодательства;
- проведение лабораторно-диагностических исследований.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие технические нормативные правовые акты в области технического нормирования и стандартизации (далее - ТНПА):

ГОСТ 8.010–2013 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 OIML R 76–1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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 3118-77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4198-75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234-77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008 Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения

ГОСТ 34668–2020 Продукция пищевая. Методы отбора и подготовка образцов (проб) для определения показателей безопасности

ГОСТ Р ИСО 5725–2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений»

ГОСТ Р ИСО 5725–4–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений

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

Примечание – При пользовании настоящей методикой измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по действующему «Указателю национальных стандартов» и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящей рекомендации следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Требования к показателям точности измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в диапазоне и с показателями точности, указанными в таблице 1.

В результате оценки показателей правильности для данной методики была установлена незначимость смещения для всех видов продукции во всем диапазоне измерений. Значения оценок относительной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблице 1.



Таблица 1 – Рабочие характеристики и показатели точности измерений, выполняемых в соответствии с методикой при использовании набора реагентов MaxSignal® для определения тетрациклина

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(10)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k=2$, $P=95$ %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 0,60 до 12,8 включ.	4,3	5,3	6	12
Молоко сухое	от 6,00 до 128 включ.	4,5	6,4	7	14
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 0,60 до 12,8 включ.	2,1	5,2	7	14
Масло сливочное, сыр, яйца, яичный порошок	от 3,00 до 32,0 включ.	3,2	5,6	7	14
Творог, творожные продукты, мороженое, сгущенное молоко	от 3,00 до 32,0 включ.	4,0	5,4	6	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы	от 1,50 до 16,0 включ.	5,2	8,3	9	18
Мед	от 3,00 до 32,0 включ.	3,3	5,3	6	12
Йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, коктейли на молочной основе	от 0,60 до 12,8 включ.	5,7	7,4	8	16



Указанные в таблице 1 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с:

- показатели прецизионности – ГОСТ Р ИСО 5725-2;
- показатели правильности – [1];
- оценки неопределенности – ГОСТ 34100.3, [1], [2].

4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам

При выполнении измерений применяются следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- весы лабораторные общего назначения по ГОСТ OIML R 76–1 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 должна быть более 5 %), например, EMax Plus, производства Molecular Devices LLC, США;
- программное обеспечение MaxSignal® ELISA Detection Analysis System, разработанное PerkinElmer, США;
- термометр лабораторный частичного погружения класса точности 1 с ценой деления 1°C по ГОСТ 28498;
- центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g, (пробирки вместимостью 2 см³), относительное центробежное ускорение не менее 4000 g и частоту вращения 4000 об/мин (пробирки вместимостью 15 см³), например, Rotofix 32A, производства Hettich Lab Technology Aps., Германия;
- лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, например, MSV-3500, производства BioSan Ltd., Латвия;
- лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин, например, термошейкер PST-60HL, производства BioSan Ltd., Латвия;
- гомогенизатор лабораторный типа ULTRA-TURRAX производства IKA® WerkeGmbH & Co. KG, Германия, например Ultra Turrax DI 25 Digital или бытовой блендер;
- баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры (75 ± 1) °C, например, WB-4MS производства BioSan Ltd, Латвия;
- холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °C до плюс 8 °C в холодильной камере и не выше минус 18 °C в морозильной камере;
- секундомер или таймер, например, секундомер электронный «Интеграл С-01» по [4], производства ОАО «ИНТЕГРАЛ» – управляющая



компания холдинга «ИНТЕГРАЛ», Республика Беларусь;

- дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников, например, Acura manual 825, Acura manual 835, Acura manual 855, производства Socorex ISBA S. A., Швейцария:

- с диапазоном объемов дозирования от 10 до 100 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более 2,5 %;

- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более 1,5 %;

- с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более 2,0 %;

- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более 2,0 %.

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

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 25 °С с точностью не менее 1 °С, например, Thermomixer comfort, производства Eppendorf AG, Германия, в комплекте с термоблоком для микротитровальных планшетов;

- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микроювету от 100 до 350 мм³, например, 3D-IW8, производства BioSan Ltd., Латвия.

- пробирки для центрифугирования из полипропилена вместимостью 15 см³;

- пробирки стеклянные вместимостью 5 см³ типа П-1-5-0,1 ХС или 10 см³ типа 11-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770;

- колбы мерные 2-100-2 или 3-100-2, 2-1000-2 или 3-1000-2 по ГОСТ 1770;

- колбы КН-1-100-14/23, КН-1-250-24/29. КН-1-500-29/32, КН-1-1000-45/40 по ГОСТ 25336;

- стаканы Н-1 - 100 или Н-1 - 150 по ГОСТ 25336;

- пипетки 1-2-20, 1-2-25 по ГОСТ 29169;

- пипетки 1-1-1-5, 1-1-1-10 по ГОСТ 29227;

- цилиндры мерные 2-25-1.2-50-1, 2-250-1 по ГОСТ 1770;

- пленка «парафильм» или скотч;

- бумага фильтровальная ФБ-III по ГОСТ 12026;

- шпатели пластиковые;

- штатив для пробирок;



- V-образные одноразовые ванночки для реагентов (для многоканальных дозаторов) вместимостью от 50 до 60 см³;
- микрофибровые салфетки, например, Ullrafine 30x30, производства Maruni Optical Co. Ltd;
- натрия фосфат двуосновной (Na₂HPO₄, каталожный номер Sigma-Aldrich S7907 или натрий фосфорнокислый двузамещенный 2-водный (Na₂HPO₄·2H₂O) ч.д.а по ГОСТ 245;
- натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233;
- калий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4234;
- натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328;
- кислота соляная ч.д.а. по ГОСТ 3118;
- калий фосфорнокислый однозамещенный х.ч. (ч.д.а.) по ГОСТ 4198;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода деионизированная;
- лабораторный детергент, например, Triton X-100;
- тетрациклин с массовой долей основного вещества не менее 98 %;
- набор реагентов MaxSignal® для определения тетрациклина (MaxSignal® Tetracycline ELISA Test Kit), производства PerkinElmer (США), состоящий из реактивов и микротитровального планшета, необходимых для выполнения измерений по определению содержания антибиотиков группы тетрациклинов методом иммуноферментного анализа. Состав набора реагентов приведен в таблице 2.

Таблица 2 – Состав набора реагентов

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых тетрациклином)	1 шт.
Основной стандарт тетрациклина массой 225 нг (порошок) для приготовления градуировочных растворов и раствора для добавки (spike-раствора)	3 шт.
Флаконы для приготовления градуировочных растворов тетрациклина с массовой концентрацией 0,00; 0,05; 0,15; 0,40; 0,80; 1,60 нг/см ³	6 шт.
Раствор антител к тетрациклину №1	12 см ³
Конъюгат антител с пероксидазой хрена (100× концентрат)	0,3 см ³
Растворитель для антител №2	20 см ³
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 см ³
Стоп-реагент	14 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Экстракционный ОХТЕТ-буфер (5× концентрат)	2 × 25 см ³

окончание таблицы 2

Компонент набора	Количество в комплекте
Растворитель для приготовления градуировочных растворов и раствора для добавки (spike-раствора)	28 см ³
ТЕТ-реагент для очистки проб молока	10 см ³
ТЕТ-буфер для доведения проб молока	25 см ³
ТЕТ-буфер для доведения проб мяса	25 см ³

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера в наборах реагентов MaxSignal®:

- 20× концентрат промывочного раствора;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

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

5 Метод измерений

Измерения массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов по настоящей методике выполняют методом, основанным на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антибиотиком группы тетрациклинов, вместе с пробой добавляют первичные антитела, специфичные к тетрациклинам. Присутствующие в пробе антибиотики группы тетрациклинов конкурирует с антибиотиком, прикрепленным к лункам планшета, за связывание с антителами. После внесения вторичных антител, конъюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с первичными антителами, связанными с антибиотиком на стенках лунки. После добавления ТМБ субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность растворов при 450 нм. Измеренная оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации тетрациклина в градуировочном растворе и антибиотиков группы тетрациклинов в растворе пробы. Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием шести градуировочных растворов.



6 Требования безопасности, охраны окружающей среды и к квалификации персонала, выполняющего измерения

6.1 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов по настоящей методике соблюдают следующие требования:

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

При выполнении измерений в соответствии с настоящей методикой используемые вещества следует собирать и утилизировать в соответствии с установленными в организации требованиями.

6.2 Требования к квалификации персонала, выполняющего измерения

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.

7 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 %.

Помещения при проведении измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

8 Требования к условиям инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшеты;



- 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 пленой «парафильм»;

- в особых случаях, которые оговорены по тексту методики измерений, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например, в ящик стола.

9 Требования к условиям хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 20 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке.

Микротитровальные планшеты должны храниться в плотно закрытой упаковке. Дополнительные рекомендации по хранению набора реагентов приведены в инструкции производителя.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе моющего средства промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой два раза и высушивают. Запрещается многократное использование одноразовой лабораторной посуды.

10.2 Приготовление растворов

10.2.1 Приготовление раствора гидроокиси натрия массовой долей 30 %

Навеску гидроокиси натрия массой 15,0 г, взвешенную с погрешностью не более 0,1 г, помещают в коническую колбу вместимостью 250 см³. В колбу приливают 35 см³ дистиллированной воды, отмеренной цилиндром. После растворения гидроокиси натрия раствор охлаждают до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С. Раствор используют свежеприготовленным.

10.2.2 Приготовление 10 мМ фосфатно-солевого буфера

Навески калия фосфорнокислого однозамещенного массой 0,240 г, калия хлористого массой 0,200 г, взвешенные с погрешностью не более

0,001 г, а также натрия фосфата двуосновного массой 1,44 г (или натрия фосфорнокислого двузамещенного 2-водного массой 1,87 г), натрия хлористого массой 8,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, перемешивают до полного растворения, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. После приготовления раствора его рН доводят до 7,4, добавляя по каплям раствор гидроокиси натрия массовой долей 30 %, приготовленный по п. 10.2.1. Раствор хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С не более одного месяца.

10.2.3 Приготовление экстракционного ОХТЕТ-буфера

В коническую колбу вместимостью 100 или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту концентрата экстракционного ОХТЕТ-буфера, добавляют мерным цилиндром в четыре раза больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата экстракционного ОХТЕТ-буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, рыбных консервов и пресервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы, креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров животных, масла, сыра, творога, творожных продуктов, мороженого, сгущенного молока, яиц, яичного порошка по формуле

$$V = \frac{6N_{smp} + V_1}{5} \quad (1)$$

где N_{smp} – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

V_1 – объем экстракционного ОХТЕТ-буфера, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 1 см³).

Экстракционный ОХТЕТ-буфер приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

10.2.4 Приготовление раствора NaOH молярной концентрацией 1 моль/дм³

Навеску гидроокиси натрия массой 4,00 г, взвешенную с погрешностью 0,01 г, вносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют дистиллированную воду в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости. После растворения гидроокиси натрия раствор доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Раствор хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в плотно

закрытой полиэтиленовой или фторопластовой посуде не более одного месяца.

10.2.5 Приготовление раствора HCl молярной концентрацией 1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ наливают от 50 до 70 см³ дистиллированной воды, затем добавляют отмеренные пипеткой 8,5 см³ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,18 г/см³. После перемешивания раствора доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают. При использовании кислоты другой плотности ее объем необходимо пересчитывать. Раствор хранят при температуре от плюс 20 °C до плюс 25 °C не более одного месяца.

10.2.6 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту 20×концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 см³ переносят в коническую колбу вместимостью 250 см³ или 500 см³ и приливают отмеренную мерным цилиндром вместимостью 25 или 100 см³ (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду, объем которой в 19 раз больше объема аликвоты 20×концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 см³, то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °C до плюс 8 °C не более шести недель в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

10.3 Подготовка набора реагентов

10.3.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от плюс 20 °C до плюс 25 °C около 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 °C до плюс 25 °C.

При работе необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты набора реагентов.

Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать остатки реагентов обратно в оригинальные флаконы.

10.3.2 Подготовка микротитровального планшета

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

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



где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с п. 10.3.1, 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 9.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят согласно схеме, предлагаемой программным обеспечением «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и подготовленных проб.

Рекомендуется одновременно использовать не более шести стрипов. Допускается выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно при выполнении требований п. 11.2.

10.3.3 Приготовление основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/см³

К содержимому флакона с основным стандартом тетрациклина добавляют 1,5 см³ растворителя для приготовления градуировочных растворов, отмеренного дозатором. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученный основной раствор тетрациклина хранению не подлежит и должен быть использован не позднее чем через 10 ч после приготовления.

10.3.4 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Градуировочные растворы тетрациклина готовят путем последовательного разбавления основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/см³, приготовленного по п. 10.3.3, следующим образом. В соответствующий флакон для хранения градуировочных растворов вносят аликвоту раствора тетрациклина и аликвоту растворителя для приготовления градуировочных растворов. Раствор тетрациклина, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот раствора и растворителя, используемые для приготовления градуировочных растворов, указаны в таблице 3. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученные градуировочные растворы тетрациклина хранению не подлежат и должны быть использованы не позднее чем через 10 ч после приготовления. После использования остатки градуировочных растворов должны быть удалены из флаконов, подлежащих хранению. Пустые флаконы должны храниться в составе набора реагентов в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С и использоваться при последующем приготовлении

градуировочных растворов.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов

Номер град. раствора	Массовая концентрация градуировочного раствора, нг/см ³	Источник аликвоты раствора тетрациклина для приготовления градуировочного раствора	Объем аликвоты раствора тетрациклина, мм ³	Объем растворителя для приготовления градуировочных растворов, мм ³
6	1,60	основной раствор	20	1855
5	0,80	град, раствор № 6	500	500
4	0,40	град, раствор № 5	500	500
3	0,15	град, раствор № 4	375	625
2	0,05	град, раствор № 3	200	400
1	0,00	-	-	500

10.3.5 Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см³ или 10 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 объемом не менее 20 мм³, добавляют дозатором в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для антител № 2. Содержимое пробирки тщательно перемешивают путем вращения или переворачивания закрытой пробирки.

Объем используемой аликвоты V , мм³, концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле

$$V = \frac{150N_w + V_1}{100} \quad (3)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых при проведении измерений, рассчитывается по п. 10.3.2;

V_1 – объем конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготавливаемого в запас, мм³ (не менее 300 мм³).

Конъюгат антител с пероксидазой № 2 приготавливается непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

10.4 Требования к отбору образцов

Отбор образцов для проведения измерений проводят по ГОСТ 34668 или иному действующему ТНПА.

10.5 Хранение образцов

Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 2 суток.



При необходимости длительного хранения образцы хранят в замороженном виде при температуре не выше минус 18 °С в течение 14 суток в упаковке, обеспечивающей отсутствие изменения массовой доли воды в образце. Перед проведением подготовки проб по п. 10.6 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

10.6 Подготовка проб

10.6.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, ультрапастеризованного молока, сливок

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают. Дозатором отбирают параллельные пробы молока объемом 1 см³ и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 мм³ и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

10.6.2 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны, варенца, простокваши, ряженки, айрана, пахты, ацидофилина и других кисломолочных продуктов, коктейлей на молочной основе

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают две параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навеске приливают небольшими порциями по 10-20 см³ дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

При наличии в образце йогурта, коктейлей частиц твердой консистенции

их отбрасывают. Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором над осадочную жидкость объемом 110 мм³ и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают. Проверяют рН с помощью индикаторной бумаги. При необходимости доводят рН раствора до 7, добавляя дозатором по каплям раствор NaOH или HCl, приготовленные по пп. 10.2.4, 10.2.5.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

10.6.3 Подготовка проб сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

От образца сухого молока отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки вместимостью 10 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 9 см³ дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают до полного растворения, после чего выдерживают в течение 15 мин и перемешивают.

Получение проб восстановленных сухих молочных смесей для детского питания проводят согласно инструкции по применению изготовителя.

Дозатором отбирают по 1 см³ молока из каждой пробы и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см³. Затем в пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 мм³ и переносят ее в стеклянные пробирки

вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

10.6.4 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают. От образца меда отбирают две параллельные навески массой 0,50 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки с закручивающимися крышками вместимостью от 15 до 50 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки и/или дозатора 9,5 см³ 10 мМ фосфатно-солевого буфера, приготовленного по п. 10.2.2. Содержимое пробирок растворяют путем интенсивного встряхивания на шейкере в течение 10 мин.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

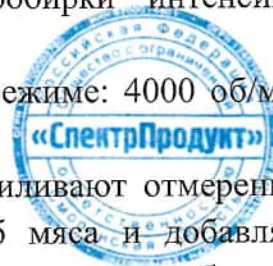
10.6.5 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, рыбных консервов и пресервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы, креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров животных

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см³ экстракционного ОХТЕТ-буфера, приготовленного по п. 10.2.3. Пробирки интенсивно встряхивают на шейкере в течение 30 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 об/мин, 10 мин.

В стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ приливают отмеренные дозатором 300 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб мяса и добавляют отобранные дозатором 200 мм³ надосадочной жидкости из пробирок с



пробами, после чего перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 30 с.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

10.6.6 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога, творожных продуктов, мороженого, сгущенного молока, яиц, яичного порошка

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Образец масла, охлажденный до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Образец творога, творожного продукта тщательно перетирают в ступке, предварительно отделив и отбросив твердые немолочные компоненты, при их наличии. Образец яиц после удаления скорлупы гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Образец яичного порошка перемешивают и восстанавливают в соответствии с п. 5.2.2 ГОСТ 30364.0. Перед отбором навесок восстановленный яичный порошок тщательно перемешивают. От образцов мороженого предварительно удаляют шоколадную глазурь, вафельную оболочку и другие отделяемые немолочные компоненты. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см³ экстракционного ОХТЕТ-буфера, приготовленного по п. 10.2.3. Пробирки с пробами выдерживают на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С в течение двух минут.

Затем пробирки с пробами помещают на шейкер и интенсивно встряхивают в течение 30 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 4000 об/мин, в течение 10 мин.

В стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ приливают отмеренные дозатором 800 мм³ 10 мМ фосфатно-солевого буфера, приготовленного по п. 10.2.2, и добавляют отобранные дозатором 200 мм³ надосадочной жидкости из пробирок с пробами, после чего перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 30 с.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения



ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

10.6.7 Получение растворов проб молока, молока сухого, сливок, молочных смесей для детского питания, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны и других кисломолочных продуктов, коктейлей на молочной основе с фактором разбавления, увеличенным по сравнению с указанным в инструкции к набору реагентов

Если при проведении измерений в соответствии с разделом 11 полученные значения оптической плотности проб меньше, чем оптическая плотность градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина $1,60 \text{ нг/см}^3$, то в случаях, указанных в п. 12.2, проводят повторные измерения растворов проб с увеличенным фактором разбавления. Приготовление растворов проб с увеличенным фактором разбавления проводят согласно п. 10.6.1, 10.6.2, 10.6.3, при этом объем используемого ТЕТ-буфера для доведения проб молока должен составлять 690 мм^3 .

11 Выполнение измерений

11.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 10.6. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с п. 10.3.

11.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно

Допускается выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно. Для этого внесение растворов антител по п. 11.3.2, конъюгата по п. 11.3.5, ТМБ субстрата по п. 11.3.8, стоп-реагента по п. 11.3.10 проводят с использованием многоканального дозатора. Отбор указанных выше реагентов многоканальным дозатором производят из предварительно наполненных отбираемым раствором одноразовых ванночек для реагентов.

При этом не допускается:

- выливать реагент из одноразовой ванночки обратно во флакон;
- использовать одноразовую ванночку повторно.

11.3 Процедура измерений

11.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 10.3.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 75 мм^3 каждого градуировочного раствора, приготовленного согласно п. 10.3.4. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке



возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00; 0,05; 0,15; 0,40; 0,80; 1,60 нг/см³). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 75 мм³ двух параллельных проб каждого образца.

11.3.2 Добавление раствора антител

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 100 мм³ раствора антител № 1. Перемешивают содержимое лунок аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола или покачивая планшет в руке в течение 1 мин.

11.3.3 Инкубация

Помещают микротитровальный планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 50 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 50 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 8.

11.3.4 Промывка планшета

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Выливают содержимое лунок микротитровального планшета путем его резкого переворачивания.

Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм³ промывочного раствора, приготовленного по п. 10.2.6 и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – три, объем заливаемого промывочного раствора - 250 мм³.

После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого сухим листом фильтровальной бумаги.

11.3.5 Добавление раствора конъюгата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором по 150 мм³ раствора конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготовленного по п. 10.3.5. Перемешивают содержимое лунок аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола или покачивая планшет в руке в течение 1 мин.

11.3.6 Инкубация

Помещают микротитровальный планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 20 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 20 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 8.



11.3.7 Промывка планшета

Промывают планшет в соответствии с п. 11.3.4.

11.3.8 Добавление ТМБ субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТМБ субстрата, после чего сразу же начинают отсчет времени инкубации. Перемешивают содержимое лунок аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола или покачивая планшет в руке в течение 1 мин.

Не допускается выливать обратно в оригинальный флакон остатки ТМБ субстрата во избежание его контаминации.

11.3.9 Инкубация

Помещают микротитровальный 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 в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 8.

11.3.10 Завершение реакции окрашивания

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Сразу же после окончания времени инкубации в каждую лунку вносят по 100 мм³ стоп-реагента и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

11.3.11 Измерение оптической плотности

Немедленно после перемешивания вытирают микрофибровой салфеткой нижнюю наружную поверхность лунок планшета и измеряют оптическую плотность лунок планшета с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

12 Порядок обработки результатов измерений

12.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в пробах

Обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса, выполняют с помощью программного обеспечения «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», далее - программное обеспечение.

Программное обеспечение выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B_0 от натурального логарифма концентрации тетрациклина вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (4)$$



где B – оптическая плотность раствора тетрациклина;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина 0,00 нг/см³;

C – концентрация тетрациклина в растворе, нг/см³;

a, b – коэффициенты линейной регрессии.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК на основании пар значений $B_i/B_0, \ln C_i$, полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i=2 \dots 6$), C_i – концентрация i -го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям оптической плотности параллельных измерений i -го градуировочного раствора.

Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, оптической плотности 1-го градуировочного раствора, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \quad (5)$$

где X – массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в пробе, мкг/кг;

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблице 4.

Таблица 4 - Факторы разбавления

Виды продукции	Фактор разбавления
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, коктейли на молочной основе	4
Молоко сухое	40
Яйца, яичный порошок, масло сливочное, сыр, мед, творог, творожные продукты, мороженое, сгущенное молоко	20
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные	10

12.2 Действия при получении результата измерений оптической плотности проб меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с максимальной массовой концентрацией

При получении хотя бы одного из результатов измерений оптической плотности параллельных проб продукции, указанной в п. 10.6.7, для которых не проводилось дополнительное разбавление по п. 10.6.7, меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией тетрациклина 1,60 нг/см³, производят действия в соответствии с п. 10.6.7, после чего повторяют измерения согласно разделу 11. Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в таких пробах рассчитывается по формуле (5) с использованием в качестве F удвоенного значения фактора разбавления пробы, приведенного таблице 4.

При получении хотя бы одного из результатов измерений оптической плотности параллельных проб продукции, указанной в п. 10.6.7, для которых проводилось дополнительное разбавление по п. 10.6.7, или параллельных проб продукции, отличной от указанной в п. 10.6.7, меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией тетрациклина 1,60 нг/см³, то рассчитывают среднее арифметическое результатов двух измерений параллельных проб по формуле (6) без проведения контроля повторяемости. Если полученное значение $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 3, то вместо окончательного результата измерений выдают одностороннюю оценку массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений согласно п. 13.2. Если полученное значение $\bar{X}$ оказывается не больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 3, то проводят расчет окончательного результата измерений по п. 12.3.

12.3 Расчет окончательного результата измерений

Рассчитывают среднее арифметическое результатов двух измерений параллельных проб по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (6)$$

где X_1 , X_2 – результаты двух измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в параллельных пробах, мкг/кг.

Если рассчитанное значение $\bar{X}$ оказывается меньше, чем значение предела измерений, указанное в разделе 3 как нижняя граница диапазона измерений, то вместо окончательного результата измерений выдают одностороннюю оценку массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения предела измерения согласно п. 13.2.

В противном случае за окончательный результат измерений принимают полученное значение $\bar{X}$ при выполнении условия повторяемости по п. 14.2. Окончательный результат измерений округляют до трех значащих цифр.

13 Форма представления результатов измерений

13.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(X)), \text{ мкг/кг} \quad (7)$$

при уровне доверия $P = 0,95$, $k = 2$,

где $\bar{X}$ – результат измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 12;

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

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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (8)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с методикой измерений, %, приведенная в таблице 1.

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

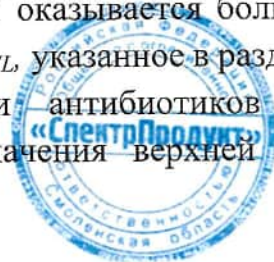
13.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ} , указанный в разделе 3 как нижняя граница диапазона измерений, то дается односторонняя оценка массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием предела измерения в виде

$$\text{менее } X_{LQ}, \text{ мкг/кг},$$

где X_{LQ} — значение предела измерений, равное нижней границе диапазона измерений согласно разделу 3.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , указанное в разделе 3, то дается односторонняя оценка массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений в виде



более X_{HL} , мкг/кг,

где X_{HL} — значение верхней границы диапазона измерений согласно разделу 3.

14 Контроль точности результатов измерений

14.1 Периодичность проведения контроля точности

Контроль точности проведения 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.

14.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р 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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (9)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (6).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (10)$$

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

r – относительное значение предела повторяемости, %, приведено в таблице 5.

При невыполнении условия (9) проводят повторные измерения согласно разделу 11.



14.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами оператор-время, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\bar{X}_1$, $\bar{X}_2$ одного и того же образца согласно разделу 11, варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости по п. 14.2. За результат измерений принимают среднее арифметическое двух результатов $\bar{X}_1$, $\bar{X}_2$,

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (11)$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abc}, \quad (12)$$

где CD_{abc} – абсолютное значение критической разности, мкг/кг, рассчитываемое по формуле

$$CD_{abc} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (13)$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 5, %.

При невыполнении условия (12) выявляют причины и принимают меры для устранения неудовлетворительного результата контроля, после чего повторно проводят измерения текущей серии образцов.

14.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения проб одного и того же образца согласно разделу 11 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 14.2.

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

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (14)$$

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_R . Если выполняется



условие,

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_R, \quad (15)$$

то оба окончательных результата, полученные двумя лабораториями, считаются приемлемыми и общее среднее значение $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (14), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (16)$$

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

k – коэффициент, равный 1,2;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 5.

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

Таблица 5 – 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, ультрапастеризованное), сливки, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	12	13	12
Молоко сухое	13	16	14
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	6	15	13
Масло сливочное, сыр, яйца, яичный порошок	9	15	13
Творог, творожные продукты, мороженое, сгущенное молоко	11	13	12

окончание таблицы 5

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отв}$, %
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы	15	22	19
Мед	10	14	12
Йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, коктейли на молочной основе	16	17	16

14.5 Контроль правильности

14.5.1 Образцы для контроля правильности

Контроль правильности производят путем измерения образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением массовой доли аналита (рабочая проба с добавкой). Контроль правильности проводится с использованием добавок тетрациклина, а также естественно или искусственно контаминированных образцов, имеющих приписанное значение массовой доли тетрациклина (например, матричные стандартные образцы). Неопределенность приписанного значения массовой доли тетрациклина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

При использовании добавок ОК представляют собой навеску пробы образца, не содержащего антибиотиков группы тетрациклинов, в которую внесена добавка раствора тетрациклина. Используемые при этом образцы до внесения добавки должны быть предварительно гомогенизированы до однородного состояния.

Оценка массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образцах

без добавки должна быть менее предела измерения данной методики. Она рассчитывается по формуле (6) на основании полученных согласно разделу 11 результатов измерений двух параллельных проб каждого такого образца. Допускается получение вышеуказанных значений оценок в образцах без добавки с помощью другой аттестованной (стандартизированной) методики, имеющей соответствующий предел измерения (обнаружения). В качестве образцов, в которые вносятся добавки, могут быть также использованы контрольные (референсные) образцы, свойства которых, в том числе приписанное изготовителем значение массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов, соответствуют указанным выше условиям.

Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой доли тетрациклина X_{am} , мкг/кг, в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (17)$$

где C_{ST} – концентрация тетрациклина в растворе, нг/см³;

V_{ST} – объем добавляемого раствора тетрациклина, см³;

m – масса навески пробы, г.

Примечание – принимается, что для сырого, пастеризованного, стерилизованного, ультрапастеризованного молока масса m численно равна объему аликвоты, см³.

Величина массовой доли тетрациклина в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из тетрациклина в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Допускается использовать для внесения добавок готовые spike-растворы тетрациклина, при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации в них не превышает 3 %.

14.5.2 Проведение контрольной процедуры

При проведении контрольной процедуры получают два результата измерений параллельных проб ОК в соответствии с требованиями раздела 11.

За результат контрольного измерения, $\overline{X}_K$, принимают результат измерения массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (14) при выполнении условия повторяемости по п. 14.2.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X}_K - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{X}_{am}, \quad (18)$$

где $K_{отн}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 5;



X_{am} – приписанное значение массовой доли тетрациклина в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (18) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

14.6 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 [3] и ГОСТ Р 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 согласно разделу 3.

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. Предварительно установленная массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения и соответствовать требованиям к образцам без добавки согласно п. 14.5.1. Рекомендуется вносить добавку тетрациклина в образцы для контроля на уровне значений массовой доли в рабочих пробах.

14.6.1 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 CL



$$CL = d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (19)$$

где σ_r – относительное СКО повторяемости, %, приведенное в таблице 1;
 d_2 – коэффициент, равный 1,128.

Предупреждающие границы

$$UCL = D_2' \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (20)$$

Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (21)$$

где D_2', D_2 – коэффициенты, равные 2,834 и 3,686, соответственно.

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

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (22)$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [3].

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формуле

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N W_i / N}{d_2}, \quad (23)$$

где N – общее число измерений (точек) на КК, для получения значений центральной линии и границ необходимо, чтобы $N = 15 \dots 20$;

d_2 – коэффициент, $d_2 = 1,128$.

14.6.2 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

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (24)$$

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

Rec_i – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i -го измерения пробы с добавкой тетрациклина, по формуле

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (25)$$

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



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

Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}, \quad (26)$$

Границы регулирования

$$UCL = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC}, \quad (27)$$

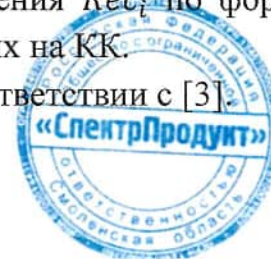
где S_{REC} – стандартное отклонение извлечения, %, рассчитываемое по формуле

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}}. \quad (28)$$

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 методикой измерений, расчета фактических значений коэффициента извлечения Rec_i по формуле (25), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [3].



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
(Проект VAM 3.2.1 Разработка и гармонизация принципов неопределенности измерений. Часть (d): Протокол оценки неопределенности на основе данных проверки, В. Дж. Барвик и С. Л. Р. Эллисон, LGC/VAM/1998/088)
- [2] ГОСТ Р ИСО 21748-2021 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений
- [3] ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта
- [4] ТУ РБ 100231303.011-2002 Секундомер электронный «Интеграл С-01»



Приложение А (обязательное)

Лист соответствия ссылочных документов, приведенных в методике измерений, и ссылочных документов, действующих в Республике Беларусь

Таблица А.1 – Сравнение ссылочных документов, приведенных в методике измерений, и ссылочных документов, действующих в Республике Беларусь¹

№ п/п	Обозначение и наименование документа, приведенного в методике измерений	Обозначение и наименование документа, действующего в Республике Беларусь
1	ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений	СТБ ISO 5725-2-2022 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
2	ГОСТ Р ИСО 5725-4-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений	СТБ ISO 5725-4-2022 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений
3	ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике	СТБ ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике
4	ГОСТ Р ИСО 21748-2021 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений	СТБ ISO 21748-2019 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерений
¹ Если стандарт заменен или изменен, то следует пользоваться заменяющим (измененным) стандартом		