

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

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

№ 143/2026 от «06» февраля 2026 г.

Методика (метод) измерений массовой доли левомицетина (хлорамфеникола) методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® в продукции животного происхождения (свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 1231/03-RA.RU.311703-2024 от 21.11.2024),

разработанная ООО «СпектрПродукт», Российская Федерация,

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

установленная в ФР.1.31.2024.50054 «Продукция животного происхождения. Методика измерений массовой доли левомицетина (хлорамфеникола) методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal®» (МИ 1013-ХЛ-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»

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «СпектрПродукт»
А.Д. Юревич
«18»  2024 г

ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ ЛЕВОМИЦЕТИНА (ХЛОРАМФЕНИКОЛА)
МЕТОДОМ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
MAXSIGNAL[®]
МИ 1013-ХЛ-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
№ 1231/03-RA.RU.311703-2024

массовой доли левомицетина (хлорамфеникола) 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 левомицетина (хлорамфеникола) методом ИФА с использованием
наборов реагентов MaxSignal®» МИ 1013-ХЛ-2024 утвержденном в ноябре 2024 года на
41 странице

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 технического директора
ФБУ «НИЦ ПМ-РОСТЕСТ»

«21»



М.П.

А.Д. Меньшиков

Приложение А
(обязательное)

Показатели точности методики (метода) измерений массовой доли левомецитина (хлорамфеникола) методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal®

Таблица 1 – Рабочие характеристики и показатели точности измерений

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{(TP)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k=2$, $P=95$ %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки	от 0,030 до 1,875 включ.	6,8	8,4	8	16
Молоко сухое	от 0,030 до 1,875 включ.	7,5	9,1	9	18
Сыр	от 0,030 до 1,50 включ.	4,8	8,1	9	18
Масло сливочное	от 0,120 до 6,00 включ.	4,9	8,9	10	20
Коктейли на молочной основе, мороженое, сгущенное молоко	от 0,200 до 18,8 включ.	6,1	6,7	10	20
Восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 0,038 до 1,88 включ.	4,1	4,8	7	14
Йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка	от 0,030 до 1,50 включ.	7,5	13	14	28
Яйца, яичный порошок	от 0,030 до 1,50 включ.	4,2	7,3	8	16
Мясо	от 0,015 до 0,750 включ.	6,3	7,5	9	18
Готовые к употреблению мясные продукты	от 0,015 до 0,750 включ.	3,3	5,0	6	12
Субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра	от 0,015 до 0,750 включ.	4,2	4,8	8	16
Сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы	от 0,015 до 0,750 включ.	7,7	8,2	13	26
Мед	от 0,030 до 1,50 включ.	5,0	7,7	9	18
Корма	от 0,100 до 7,50 включ.	9,8	10,6	8	16

Заместитель директора Менделеевского филиала
ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест»



А.А. Марутин

117418 Москва, Нахимовский пр., 31
Call-Центр: 495-544-00-00
тел. 499-129-19-11 факс: 499-124-99-96
E-mail: info@rostest.ru, www.rostest.ru

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«СПЕКТРПРОДУКТ»
ООО «СпектрПродукт»

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «СпектрПродукт»
А.Д. Юревич
«09» 2025 г.

Извещение об изменении № 1

ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ ЛЕВОМИЦЕТИНА (ХЛОРАМФЕНИКОЛА)
МЕТОДОМ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
MAXSIGNAL®
МИ 1013-ХЛ-2024

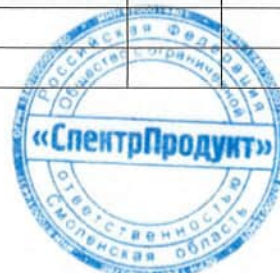


Экземпляр №

Передан ООО «ПионерПродукт»

Смоленск
2025

ООО «СпектрПродукт»		ИЗВЕЩЕНИЕ № 1		ОБОЗНАЧЕНИЕ ДОКУМЕНТА МИ 1013-ХЛ-2024	
Дата выпуска		Срок изменения		Лист 2	Листов 2
ПРИЧИНА		Актуализация данных и информации в части нормативных ссылок			Код -
УКАЗАНИЕ О ЗАДЕЛЕ					
УКАЗАНИЕ О ВНЕДРЕНИИ					
ПРИМЕНЯЕМОСТЬ					
РАЗОСЛАТЬ		Всем абонентам			
ПРИЛОЖЕНИЕ		На 41 листах			
ИЗМ.		СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ			
1	Листы 2-41 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 «18» ноября 2024 г. Генеральным директором ООО «СпектрПродукт» А.Д. Юревичем

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «21» ноября 2024 г. №1231/130-RA.RU.311703-2024, выдано ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ ФР.1.31.2024.50054

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 экстракционного буфера для образцов	14
10.2.2 Приготовление промывочного раствора.....	15
10.3 Подготовка набора реагентов.....	15
10.3.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов.....	15
10.3.2 Подготовка микротитровального планшета	15
10.4 Требования к отбору образцов.....	16
10.5 Хранение образцов.....	16
10.6 Подготовка проб.....	16
10.6.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, ультрапастеризованного молока, сливок, сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания, коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока	16
10.6.1.1 Восстановление сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания	16
10.6.1.2 Получение разбавленных проб коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока	17
10.6.1.3 Получение обезжиренных проб молока, сливок, восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, разбавленных проб коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока	17
10.6.1.4 Получение растворов проб молока, сливок, восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, разбавленных проб коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока	18
10.6.2 Подготовка проб масла сливочного	18
10.6.3 Подготовка проб сыра.....	19
10.6.4 Подготовка проб яиц, яичного порошка	20
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	21
10.6.6 Подготовка проб сала, в т.ч. шпика, жиров животных.....	22
10.6.7 Подготовка проб йогурта, кефира, сметаны, варенца, простокваши, ряженки, айрана, пахты, ацидофилина и других кисломолочных продуктов, творога, творожных продуктов, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки.....	23
10.6.8 Подготовка проб меда.....	24
10.6.9 Подготовка проб корма.....	24
10.6.10 Подготовка холостой пробы	25



11	Выполнение измерений	27
11.1	Общие требования.....	27
11.2	Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно.....	27
11.3	Процедура измерений.....	27
11.3.1	Внесение градуировочных растворов и растворов проб	28
11.3.2	Добавление раствора конъюгата.....	28
11.3.3	Инкубация.....	28
11.3.4	Промывка планшета.....	28
11.3.5	Добавление ТМБ субстрата.....	28
11.3.6	Инкубация.....	29
11.3.7	Завершение реакции окрашивания.....	29
11.3.8	Измерение оптической плотности.....	29
12	Порядок обработки результатов измерений	29
12.1	Расчет массовой доли хлорамфеникола в пробах	29
12.2	Расчет окончательного результата измерений	31
12.3	Контроль холостой пробы.....	31
13	Форма представления результатов измерений.....	32
13.1	Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности	32
13.2	Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли.....	32
14	Контроль точности результатов измерений	33
14.1	Периодичность проведения контроля точности.....	33
14.2	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	33
14.3	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	33
14.4	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.....	34
14.5	Контроль правильности.....	36
14.5.1	Образцы для контроля правильности.....	36
14.5.2	Проведение контрольной процедуры.....	37
14.6	Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)	37
14.6.1	Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости	38
14.6.2	Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности.....	39
	Библиография	40
	Приложение А	41



1 Вводная часть

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли левомицетина (хлорамфеникола) в указанной ниже продукции животного происхождения, в том числе сырье, и кормах методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов MaxSignal® для определения хлорамфеникола, 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, корма и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания левомицетина (хлорамфеникола).

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

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

ГОСТ Р 58144-2018 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 8.010-2013 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Методики выполнения измерений. Основные положения

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

ГОСТ 12.2.003-91 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Оборудование производственное. Общие требования безопасности

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

ГОСТ 9293-74 (ИСО 2435-73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0-2016 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 22300-76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. 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 (ИСО 648-77) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

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 ISO 6497-2014 Корма. Отбор проб

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 хлорамфеникола 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 хлорамфеникола

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(PO)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k=2$, $P=95$ %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки	от 0,030 до 1,875 включ.	6,8	8,4	8	16



продолжение таблицы 1

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k=2$, $P=95$ %
Молоко сухое	от 0,030 до 1,875 включ.	7,5	9,1	9	18
Сыр	от 0,030 до 1,50 включ.	4,8	8,1	9	18
Масло сливочное	от 0,120 до 6,00 включ.	4,9	8,9	10	20
Коктейли на молочной основе, мороженое, сгущенное молоко	от 0,200 до 18,8 включ.	6,1	6,7	10	20
Восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 0,038 до 1,88 включ.	4,1	4,8	7	14
Йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка	от 0,030 до 1,50 включ.	7,5	13	14	28
Яйца, яичный порошок	от 0,030 до 1,50 включ.	4,2	7,3	8	16
Мясо	от 0,015 до 0,750 включ.	6,3	7,5	9	18
Готовые к употреблению мясные продукты	от 0,015 до 0,750 включ.	3,3	5,0	6	12
Субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра	от 0,015 до 0,750 включ.	4,2	4,8	8	16



окончание таблицы 1

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k=2$, $P=95$ %
Сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы	от 0,015 до 0,750 включ.	7,7	8,2	13	26
Мед	от 0,030 до 1,50 включ.	5,0	7,7	9	18
Корма	от 0,100 до 7,50 включ.	9,8	10,6	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 15 см³) и охлаждение до температуры 10 °C, например, 1236R, производства LaboGene Aps, Дания;

- 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® Werke GmbH & Co. KG, Германия, например Ultra Turrax DI 25 Digital или бытовой блендер;

- роторный испаритель в комплекте с водяной баней, обеспечивающей поддержание температуры (60 ± 5) °C, например, Plei-VAP Value/GI, производства Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия;

- баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры (40 ± 5) °C, (60 ± 5) °C, (80 ± 5) °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 [6], производства ОАО «ИНТЕГРАЛ» - управляющая компания холдинга «ИНТЕГРАЛ», Республика Беларусь;

- дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников, например, Asura manual 825, Asura manual 835, Asura 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 плюс 20 °C до плюс 25 °C с точностью не менее 1 °C, 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 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-Ш 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;

- вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144 или вода деионизированная;

- лабораторный детергент, например, Triton X-100;

- азот газообразный повышенной чистоты 1 сорт по ГОСТ 9293;

- этилацетат ч.д.а. по ГОСТ 22300;

- н-гексан ч.д.а. по [3].

- ацетонитрил с массовой долей основного вещества 99,9 %, например, ацетонитрил т.ч. по [5];

- хлорамфеникол с массовой долей основного вещества не менее 98 %;

- набор реагентов MaxSignal[®] для определения хлорамфеникола (MaxSignal[®] Chloramphenicol ELISA Test Kit) производства PerkinElmer (США), состоящий из реактивов и микротитровального планшета, необходимых для выполнения измерений по определению содержания хлорамфеникола 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 антителами к хлорамфениколу)	1 шт.
Градуировочные растворы хлорамфеникола с концентрацией 0; 0,015; 0,030; 0,150; 0,500; 1,500 нг/см ³	6 шт. по 1,8 см ³
Конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена	8,0 см ³
10×концентрат экстракционного буфера для образцов	25 см ³
20×концентрат промывочного раствора	28 см ³
Стоп-реагент	14 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Экстракционный буфер А	20 см ³
Экстракционный буфер В	20 см ³
Буфер для доведения проб	6 см ³
Раствор для добавки (spike-раствор) хлорамфеникола с концентрацией 10 нг/см ³	1,8 см ³
Экстракционный буфер для хлорамфеникола (CAP Extraction Buffer)	2 шт. по 28 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 хлорамфеникола по настоящей методике выполняют методом, основанным на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антителами к хлорамфениколу, вместе с раствором пробы или градуировочным раствором добавляют конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена. Присутствующий в пробе хлорамфеникол конкурирует с конъюгированным пероксидазой хлорамфениколом за связывание с антителами, прикрепленными к лункам планшета. Интенсивность окраски,

образующейся после добавления ТМБ субстрата, обратно пропорциональна концентрации хлорамфеникола в растворе. Оптическая плотность растворов измеряется при 450 нм. Массовая концентрация хлорамфеникола 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 хлорамфеникола 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 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 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 2 °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 экстракционного буфера для образцов

Аликвоту 10×концентрата экстракционного буфера для образцов, отмеренную дозатором или пипеткой, переносят в коническую колбу вместимостью 100 или 250 см³ в зависимости от объема аликвоты, добавляют в 9 раз больший объем дистиллированной воды, отмеренный цилиндром, и перемешивают. Объем аликвоты концентрата, необходимый для

приготовления экстракционного буфера для анализа N_{smp} образцов в двух параллелях (по две навески из каждого образца), составляет:

- масло, яйца, восстановленный яичный порошок, мясо, готовые к употреблению мясные продукты, консервы мясные и мясорастительные, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, икра, креветки, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы - $(0,2 \cdot N_{smp} + 0,1) \text{ см}^3$;
- сыр, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, мед - $(0,1 \cdot N_{smp} + 0,1) \text{ см}^3$;
- йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка - $(0,08 \cdot N_{smp} + 0,1) \text{ см}^3$;
- корма - $(0,28 \cdot N_{smp} + 0,1) \text{ см}^3$.

Раствор используют свежеприготовленным.

10.2.2 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту $20 \times$ концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 см^3 переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3 или 500 см^3 и приливают отмеренную мерным цилиндром вместимостью 25 или 100 см^3 (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду, объем которой в 19 раз больше объема аликвоты $20 \times$ концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 см^3 , то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см^3 . Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более одного месяца 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 °С до плюс 25 °С около 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

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



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

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.

10.4 Требования к отбору образцов

Отбор образцов для проведения измерений проводят по ГОСТ 34668, ГОСТ ISO 6497, ГОСТ 13496.0 или иному действующему ТНПА.

10.5 Хранение образцов

Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение двух 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, сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания, коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока

10.6.1.1 Восстановление 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.

В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают две параллельные навески образца сухого молока или сухих молочных смесей для детского



питания, взвешенные с точностью до 0,1 г. Массы навесок сухого молока 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.

Массы навесок сухих молочных смесей для детского питания рассчитывают, используя отношение массы смеси к объему воды, указанное в инструкции производителя.

Затем небольшими порциями по 10 - 20 см³ приливают дистиллированную воду, нагретую до температуры плюс 40 °С, перемешивая содержимое вращением колбы или стеклянной палочкой до полного растворения образца. Раствор охлаждают до температуры от плюс 18 °С до плюс 22 °С, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

10.6.1.2 Получение разбавленных проб коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока

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

В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают две параллельные навески массой 10,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г. Затем небольшими порциями по 10 - 20 см³ приливают дистиллированную воду, нагретую до температуры плюс 40 °С, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения образца. Раствор охлаждают до температуры от плюс 18 °С до плюс 22 °С, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

10.6.1.3 Получение обезжиренных проб молока, сливок, восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, разбавленных проб коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока

Для подготовки проб молока и сливок 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. Перед взятием аликвоты испытуемый образец тщательно перемешивают.

От образца молока и сливок, подготовленных как описано выше, от восстановленного сухого молока и восстановленных сухих молочных смесей

для детского питания, полученных по пункту 10.6.1.1, от разбавленных проб коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока, полученных по п. 10.6.1.2, с помощью пипетки или дозатора отбирают две параллельные пробы объемом по 10 см^3 и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 . Центрифугируют пробы в следующем режиме: плюс 10°C , 4000 g, 10 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение от 10 до 15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 7°C до плюс 8°C , контролируя температуру термометром.

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

10.6.1.4 Получение растворов проб молока, сливок, восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, разбавленных проб коктейлей на молочной основе, мороженого, сгущенного молока

Аликвоты обезжиренной пробы, полученной по п. 10.6.1.3, объемом 1 см^3 , отобранные дозатором из каждой пробы, переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5\text{--}2 \text{ см}^3$ (перед тем, как вылить образец в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления возможных следов жира). Затем в пробирки добавляют 50 мм^3 экстракционного буфера А, встряхивают 5 с, сразу же добавляют 50 мм^3 экстракционного буфера В, и перемешивают содержимое пробирки на вортексе на максимальной скорости в течение 30 с.

Пробирки центрифугируют в одном из двух режимов:

- от плюс 20°C до плюс 25°C , 4000 g, 10 мин;
- от плюс 20°C до плюс 25°C , 10000 g, 2 мин.

Дозатором переносят 440 мм^3 надосадочной жидкости в новые пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5\text{--}2 \text{ см}^3$, добавляют в пробирки 60 мм^3 буфера для доведения проб, и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

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

10.6.2 Подготовка проб масла сливочного

Образец масла, отобранный в соответствии с п. 10.4, охлажденный до температуры не выше минус 10°C , измельчают с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца масла от 20°C до 25°C , выдерживая его при температуре окружающей среды.

От образца отбирают две параллельные навески массой $2,00 \text{ г}$, взвешенные с точностью до $0,01 \text{ г}$, и помещают их в пробирки для



центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки с пробами добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 1 см³ экстракционного буфера для хлорамфеникола. Пробирки выдерживают на водяной бане при температуре (40±5) °С до расплавления навески масла. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают до образования однородной смеси. Затем в пробирки добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 4 см³ ацетонитрила, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 0,5 см³, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³.

Выпаривают ацетонитрил из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре (60 ± 5) °С досуха.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом 1 см³ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости.

Полученные водные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

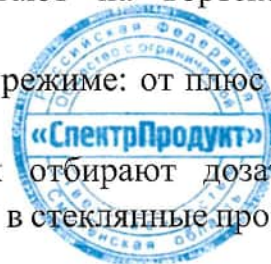
10.6.3 Подготовка проб сыра

Доводят температуру образца сыра, отобранного в соответствии с п. 10.4, 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 2,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки с пробами добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 1 см³ экстракционного буфера для хлорамфеникола. Пробирки выдерживают на водяной бане при температуре (40 ± 5) °С до расплавления навески сыра. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают до образования однородной смеси. Затем в пробирки добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 2 см³ ацетонитрила и 2 см³ этилацетата и перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 10 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 1 см³, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³.



Выпаривают растворитель из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ досуха.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом $0,5\text{ см}^3$ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20°C до плюс 25°C , 4000 g, в течение 5 мин. Для проведения ИФА используют средний (водный слой), избегая попадания в отбираемый раствор верхнего слоя жира. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C в течение двух часов.

10.6.4 Подготовка проб яиц, яичного порошка

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20°C до плюс 25°C , выдерживая его при комнатной температуре. 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 гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 10 см^3 этилацетата. Содержимое пробирок встряхивают несколько раз, после чего дополнительно перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20°C до плюс 25°C , 4000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором недостаточную жидкость объемом 5 см^3 и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 .

Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 2 см^3 , перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом 1 см^3 и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 .

Пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20°C до плюс



25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой. Если после центрифугирования образуется эмульсия, то дозатором удаляют максимально возможный объем верхнего органического слоя, выдерживают пробирки на водяной бане при температуре (80 ± 5) °С в течение 3 мин, затем охлаждают до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С и центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин, после чего удаляют дозатором оставшийся верхний органический слой.

Водные растворы проб используют 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

От образца, отобранного в соответствии с п. 10.4, удаляют несъедобные части, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 3,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 6 см³ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают несколько раз, после чего дополнительно перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 4 см³, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³.

Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре (60 ± 5) °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 2 см³, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом 1 см³ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования

вместимостью 15 см³.

Пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой. Если после центрифугирования образуется эмульсия, то дозатором удаляют максимально возможный объем верхнего органического слоя, выдерживают пробирки на водяной бане при температуре (80 ± 5) °С в течение 3 мин, затем охлаждают до температуры от 20 °С до 25 °С и центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин, после чего удаляют дозатором оставшийся верхний органический слой.

Водные растворы проб используют 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 сала, в т.ч. шпика, жиров животных

От образца, отобранного в соответствии с п. 10.4, удаляют несъедобные части, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 3,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 6 см³ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают несколько раз, после чего дополнительно перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 2 см³, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³.

Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре (60 ± 5) °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 1 см³, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом 0,5 см³ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³.

Пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой. Если после центрифугирования образуется эмульсия, то дозатором удаляют максимально возможный объем верхнего органического слоя, выдерживают пробирки на водяной бане при температуре 80 °С в течение 3 мин, затем охлаждают до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С и центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин, после чего удаляют дозатором оставшийся верхний органический слой.

Водные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

10.6.7 Подготовка проб йогурта, кефира, сметаны, варенца, простокваши, ряженки, айрана, пахты, ацидофилина и других кисломолочных продуктов, творога, творожных продуктов, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки

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.

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 дистиллированную воду небольшими порциями по 10 - 20 см³, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Образец творога, творожного продукта тщательно перетирают в ступке.

При наличии в образце частиц твердой консистенции их отбрасывают.

Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают или гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой 5 см³ этилацетата. Содержимое пробирок встряхивают несколько раз, после чего дополнительно перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 5 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 2 см³ и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³.



Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом 400 мм^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин на максимальной скорости.

Водные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C в течение двух часов.

10.6.8 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с пунктом 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20°C до плюс 25°C , выдерживая его при температуре окружающей среды. От образца меда отбирают две параллельные навески массой $2,00\text{ г}$, взвешенные с погрешностью $0,01\text{ г}$. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 1 см^3 экстракционный буфер для хлорамфеникола. Пробирки встряхивают до полного растворения меда, после чего добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 4 см^3 ацетонитрила. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 3 мин на максимальной скорости.

Пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20°C до плюс 25°C , 4000 g , в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 1 см^3 и помещают ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 .

Выпаривают ацетонитрил из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ до отсутствия запаха ацетонитрила.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом $0,5\text{ см}^3$ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости.

Подготовленные таким образом пробы используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C в течение двух часа.

10.6.9 Подготовка проб корма

Образец корма, отобранный в соответствии с п. 10.4, гомогенизируют.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески



массой 2,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки с пробами добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 6 см³ этилацетата и перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетатный слой) объемом 3 см³, и переносят ее в новые пробирки.

Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре (60 ± 5) °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют 2 см³ н-гексана и отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом 1 см³ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин.

С помощью пипетки Пастера или дозатора удаляют верхний гексановый слой. Дозатором отбирают в чистую пробирку на 1,5 - 2,0 см³ 100 мм³ нижнего водного слоя. Требуется осторожность, чтобы не захватить остатки гексана на границе раздела фаз. Дозатором в ту же пробирку вносят 400 мм³ экстракционного буфера для образцов, приготовленного по п. 10.2.1, и тщательно встряхивают.

Полученные водные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

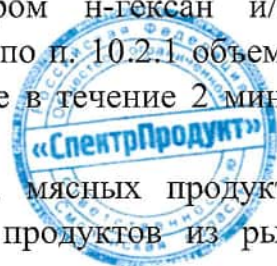
10.6.10 Подготовка холостой пробы

В две стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ приливают отмеренные пипеткой или дозатором этилацетат и/или ацетонитрил объемами, указанными в таблице 3.

Выпаривают растворитель (смесь растворителей) из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре (60 ± 5) °С до отсутствия запаха этилацетата (ацетонитрила).

В пробирки добавляют отмеренный дозатором н-гексан и/или экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 10.2.1, объемом, указанными в таблице 3, и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости.

Для проб сыра, яиц, яичного порошка, мяса, мясных продуктов, полуфабрикатов и консервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы,



креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров животных, корма после перемешивания на вортексе содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой.

Для проб корма после центрифугирования и удаления верхнего органического слоя дозатором осторожно отбирают, чтобы не захватить остатки гексана на границе раздела фаз, в чистую пробирку вместимостью 1,5 - 2,0 см³ 100 мм³ нижнего водного слоя. Дозатором в ту же пробирку вносят 400 мм³ экстракционного буфера для образцов, приготовленного по п. 10.2.1, и тщательно встряхивают.

Полученные растворы проб используют для проведения ИФА при контроле холостой пробы с периодичностью согласно п. 12.3. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

Таблица 3 – Объемы реактивов, используемых при подготовке холостой пробы

Виды продукции	Пункт методики, описывающий подготовку проб	Объемы растворителей, взятых для выпаривания	Объем н-гексана, добавляемого к сухому остатку	Объем добавляемого экстракционного буфера для образцов
Масло сливочное	10.6.2	0,5 см ³ ацетонитрила	-	1 см ³
Сыр	10.6.3	0,5 см ³ ацетонитрила, 0,5 см ³ этилацетата	-	0,5 см ³
Яйца, яичный порошок	10.6.4	5 см ³ этилацетата	2 см ³	1 см ³
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	10.6.5	4 см ³ этилацетата	2 см ³	1 см ³



окончание таблицы 3

Виды продукции	Пункт методики, описывающий подготовку проб	Объемы растворителей, взятых для выпаривания	Объем н-гексана, добавляемого к сухому остатку	Объем добавляемого экстракционного буфера для образцов
Сало, в т.ч. шпик, жиры животные	10.6.6	2 см ³ этилацетата	1 см ³	0,5 см ³
Йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка	10.6.7	2 см ³ этилацетата	-	400 мм ³
Мед	10.6.8	1 см ³ ацетонитрила	-	0,5 см ³
Корма	10.6.9	3 см ³ этилацетата	2 см ³	1 см 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 конъюгата по п. 11.3.2, ТМБ субстрата по п. 11.3.5, стоп-реагента по п. 11.3.7 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 100 мм^3 каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0; 0,015; 0,030; 0,150; 0,500; $1,500 \text{ нг/см}^3$). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 100 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

11.3.2 Добавление раствора конъюгата

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 50 мм^3 раствора конъюгата. 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°C до плюс 25°C 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 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 мм^3 промывочного раствора, приготовленного по п. 10.2.2 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 мм^3 .

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

11.3.5 Добавление ТМБ субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм^3 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.

11.3.6 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 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.

11.3.8 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 хлорамфеникола 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 хлорамфеникола вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (2)$$

где B – оптическая плотность раствора хлорамфеникола;

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

C – концентрация хлорамфеникола 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.

Если в результате проведения контроля холостой пробы согласно п. 12.3, условие (6) не выполняется, то для расчета массовой доли хлорамфеникола в пробе применяется следующая формула

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right) - X_{BL}, \quad (3)$$

где X – массовая доля хлорамфеникола в пробе, мкг/кг;

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

X_{BL} – массовая доля хлорамфеникола в холостой пробе, мкг/кг, определяемая согласно п. 12.3;

F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблице 4.

Таблица 4 - Факторы разбавления

Виды продукции	Фактор разбавления
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	1,25
Сыр, яйца, яичный порошок, мед, йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка	1
Масло сливочное	4
Коктейли на молочной основе, мороженое, сгущенное молоко	12,5
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	0,5
Корма	5

Если в результате проведения контроля холостой пробы согласно п. 12.3, условие (6) выполняется, то массовая доля хлорамфеникола в пробе рассчитывается по формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \quad (4)$$

Для проб молока, сухого молока, сгущенного молока, сливок, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, коктейлей на

молочной основе, мороженого контроль холостой пробы не проводят и расчет всегда выполняют по формуле (4).

12.2 Расчет окончательного результата измерений

Рассчитывают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (5)$$

где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой доли хлорамфеникола 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 хлорамфеникола в образце с использованием значения предела измерения согласно п. 13.2.

Если рассчитанное значение $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение предела измерений, указанное в разделе 3 как верхняя граница диапазона измерений, то вместо окончательного результата измерений выдают одностороннюю оценку массовой доли хлорамфеникола 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 третьего десятичного знака после запятой.

12.3 Контроль холостой пробы

Для контроля чистоты реактивов и посуды проводят анализ холостой пробы при подготовке проб всех видов продукции, кроме молока, сухого молока, сгущенного молока, сливок, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, коктейлей на молочной основе, мороженого.

Для этого выполняют процедуру подготовки холостой пробы согласно п. 10.6.10. Рассчитывают массовую долю хлорамфеникола в холостой пробе X_{BL} , мкг/кг, по формулам (4), (5), используя значения фактора разбавления для соответствующих видов продукции, приведенные в таблице 4.

Если полученное значение массовой доли хлорамфеникола в холостой пробе удовлетворяет условию (6), то массовую долю в холостой пробе при расчете результатов измерений проб не учитывают, т.е. расчет проводят по формуле (4).

$$X_{BL} \leq 0,015 \cdot F, \quad (6)$$

где F – фактор разбавления, приведенный в таблице 4,

Если полученное значение массовой доли хлорамфеникола в холостой пробе не удовлетворяет условию (6), то массовую долю в холостой пробе при расчете результатов измерений проб учитывают, т.е. расчет проводят по



формуле (3).

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

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 хлорамфеникола, 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 хлорамфеникола в образце с использованием предела измерения в виде

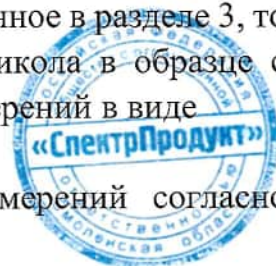
$$\text{менее } X_{LQ}, \text{ мкг/кг},$$

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 хлорамфеникола в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений в виде

$$\text{более } X_{HL}, \text{ мкг/кг},$$

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 значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (5).

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

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

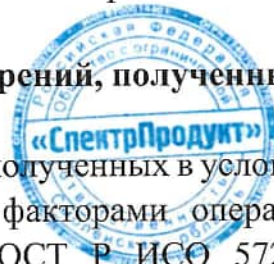
где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений параллельных проб одного образца, мкг/кг;

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 значение 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 значение $\bar{\bar{X}}$, 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

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

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

k – коэффициент, равный 1,3;

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 $K_{опт}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки	19	20	14
Молоко сухое	21	20	14
Сыр	14	21	19
Масло сливочное	14	23	21
Коктейли на молочной основе, мороженое, сгущенное молоко	17	14	17
Восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	11	11	13
Яйца, яичный порошок	12	20	17
Мясо	18	17	14
Готовые к употреблению мясные продукты	10	12	12
Субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра	12	11	13
Сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы	22	17	21
Йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка	21	32	29
Мед	14	20	14
Корма	27	22	19

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 хлорамфеникола, а также естественно или искусственно контаминированных образцов, имеющих приписанное значение массовой доли хлорамфеникола (например, матричные стандартные образцы). Неопределенность приписанного значения массовой доли хлорамфеникола в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

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

Оценка массовой доли хлорамфеникола в образцах без добавки должна быть менее предела измерения данной методики. Она рассчитывается по формуле (5) 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 хлорамфеникола, соответствуют указанным выше условиям.

Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой доли хлорамфеникола 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 хлорамфеникола в растворе, нг/см³;

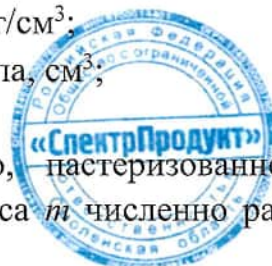
V_{ST} – объем добавляемого раствора хлорамфеникола, см³;

m – масса навески пробы, г.

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

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

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из хлорамфеникола в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.



Допускается использовать для внесения добавок готовые spike-растворы хлорамфеникола, при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации хлорамфеникола 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 хлорамфеникола в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (14) при выполнении условия повторяемости по п. 14.2.

Критерием приемлемости является условие

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

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

$X_{ат}$ – приписанное значение массовой доли хлорамфеникола 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 [4] 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 хлорамфеникола. Предварительно установленная массовая доля хлорамфеникола 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 хлорамфеникола в образцы для контроля на уровне значений массовой доли рабочих проб.

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 [4].

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 хлорамфеникола, по формуле

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

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

X_{exp} – рассчитанное (приписанное) значение массовой доли хлорамфеникола 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 [4].



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] ТУ 2631-003-05807999-98 Реактивы. Н-гексан
- [4] ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта
- [5] ТУ 2636-092-44493179-04 Ацетонитрил (нитрил уксусной кислоты, метилцианид)
- [6] 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 58144-2018 Вода дистиллированная. Технические условия	ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия
2	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
3	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
4	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
5	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

¹Если стандарт заменен или изменен, то следует пользоваться заменяющим (измененным) стандартом