

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

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

№ 157/2026 от «07» августа 2026 г.

Методика (метод) измерений массовой доли метаболитов нитрофуранов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® (свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 817/03-RA.RU.311703-2025 от 05.06.2025),

разработанная ООО «СпектрПродукт», Российская Федерация,

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

установленная в ФР.1.31.2025.51697 «Продукция животного происхождения. Методика измерений массовой доли метаболитов нитрофуранов методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal®» (МИ 1015-МН-2025) 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 05.08.2026 № 04-06/909).

Заместитель директора



М.П.

Ю.С.Иванов

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

«07» августа 2026 г.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«СПЕКТРПРОДУКТ»
ООО «СпектрПродукт»



А.Д. Юревич
2025 г.

ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ МЕТАБОЛИТОВ НИТРОФУРАНОВ МЕТОДОМ
ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ MAXSIGNAL®
МИ 1015-MH-2025

КОПИЯ
ВЕРНА



Экземпляр № 1

Передан ООО «ПионерПродукт»

Смоленск
2025



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
№ 817/03-RA.RU.311703-2025**

массовой доли метаболитов нитрофуранов методом ИФА с использованием наборов
реагентов MaxSignal®

при необходимости указывают объект и метод измерения

разработанной ООО «СпектрПродукт», 214000, Смоленская область, г Смоленск, пер
Ульянова, д. 7, помещение 2 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 метаболитов нитрофуранов методом ИФА с использованием
наборов реагентов MaxSignal® МИ 1015-МН-2025 утвержденном в июне 2025 года на
36 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»

А.Д. Меньшиков

«05» июня 2025 г.



**Приложение А
(обязательное)**

**Показатели точности методики (метода) измерений массовой доли метаболитов
нитрофуранов методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal®**

Метаболиты нитрофуранов	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относи- тельное стандартное отклонение повтора- емости $\sigma_r, \%$	Относи-тельное стандартное отклонение промежу- точной прецизион- ности $\sigma_{I(70)}, \%$	Относи- тельная стандартная неопреде- ленность $u, \%$	Относи-тельная расширенная неопреде- ленность $U, \%,$ $k=2, P=95 \%$
AMAZ	от 0,20 до 12,80 включ.	6,3	7,5	8,0	16,0
AOZ	от 0,10 до 3,24 включ.	6,0	6,8	7,0	14,0
AND	от 0,20 до 12,80 включ.	6,3	8,0	8,0	16,0
SEM	от 0,20 до 12,80 включ.	6,4	7,4	8,0	16,0

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

2026 г.

Извещение об изменении № 1

**ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ МЕТАБОЛИТОВ НИТРОФУРАНОВ МЕТОДОМ
ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ MAXSIGNAL®
МИ 1015-МН-2025**



Экземпляр № 1



Передан ООО «ПионерПродукт»

Смоленск
2026

ООО «СпектрПродукт»		ИЗВЕЩЕНИЕ № 1		ОБОЗНАЧЕНИЕ ДОКУМЕНТА МИ 1015-МН-2025			
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 36 листах					
ИЗМ.	СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ						
1	Листы 2 - 36 заменить. 						
Составил							
Проверил				Н.контр.			
Изменение внес							

Предисловие

1 РАЗРАБОТАНА Обществом с ограниченной ответственностью «СпектрПродукт» (ООО «СпектрПродукт») (214000, Смоленская область, г. Смоленск, пер. Ульянова, д. 7, помещение 2, 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 «03» июня 2025 г. Генеральным директором ООО «СпектрПродукт» А.Д. Юревичем

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «05» июня 2025 г. № 817/03-RA.RU.311703-2025, выдано ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ ФР.1.31.2025.51697

ВНЕСЕНЫ ИЗМЕНЕНИЯ № 1 «02» апреля 2026 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	8
5 Метод измерений	11
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды и к квалификации персонала, выполняющего измерения.....	12
6.1 Требования безопасности, охраны окружающей среды.....	12
6.2 Требования к квалификации персонала, выполняющего измерения	12
7 Требования к условиям измерений.....	12
8 Требования к условиям инкубации микротитровальных планшетов в помещении.....	13
9 Требования к условиям хранения набора реагентов.....	13
10 Подготовка к выполнению измерений.....	13
10.1 Подготовка лабораторной посуды.....	13
10.2 Приготовление растворов.....	14
10.2.1 Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия.....	14
10.2.2 Приготовление 1 М раствора соляной кислоты	14
10.2.3 Приготовление 0,1 М раствора соляной кислоты	14
10.2.4 Приготовление 0,1 М раствора калия фосфорнокислого двузамещенного	14
10.2.5 Приготовление буфера для экстракции образцов	14
10.2.6 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 Получение экстрактов проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, ультрапастеризованного молока, сливок	16
10.6.2 Получение экстрактов проб сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания	17
10.6.3 Получение экстрактов проб мяса, субпродуктов, рыбы, креветок.....	18
10.6.4 Получение экстрактов проб яиц, яичного порошка.....	19
10.6.5 Получение экстрактов проб меда	20
10.6.6 Получение экстрактов проб сгущенного молока	21
10.6.7 Подготовка холостой пробы	22
10.6.8 Получение подготовленных растворов проб.....	22
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 конъюгата с пероксидазой хрена.....	23
11.3.3 Инкубация.....	24
11.3.4 Промывка планшета.....	24



11.3.5 Добавление ТМБ субстрата.....	24
11.3.6 Инкубация.....	24
11.3.7 Завершение реакции окрашивания.....	24
11.3.8 Измерение оптической плотности.....	25
12 Порядок обработки результатов измерений.....	25
12.1 Расчет массовой доли метаболитов нитрофуранов.....	25
12.2 Расчет окончательного результата измерений.....	26
12.3 Контроль холостой пробы.....	26
13 Форма представления результатов измерений.....	27
13.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности.....	27
13.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли.....	27
14 Контроль точности результатов измерений.....	28
14.1 Периодичность проведения контроля точности.....	28
14.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	28
14.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности.....	28
14.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.....	29
14.5 Контроль правильности.....	30
14.5.1 Образцы для контроля правильности.....	30
14.5.2 Проведение контрольной процедуры.....	31
14.6 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК).....	32
14.6.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости.....	32
14.6.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности.....	33
Библиография.....	35
Приложение А.....	36



1 Вводная часть

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли метаболитов нитрофуранов (AMOZ, AOZ, AHD, SEM) в указанной ниже продукции животного происхождения, в том числе сырье и кормах, методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов MaxSignal® для определения метаболитов нитрофуранов, далее наборы реагентов:

MaxSignal® Furaltadone (AMOZ) ELISA Test Kit,
 MaxSignal® Nitrofurazone (SEM) ELISA Test Kit,
 MaxSignal® Furazolidone (AOZ) ELISA Test Kit,
 MaxSignal® Nitrofurantoin (AHD) ELISA Test Kit.

Область применения методики включает в себя следующие виды продукции: молоко (сырое, пастеризованное, ультрапастеризованное, стерилизованное), молоко сухое восстановленное, сгущенное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, сливки, мясо, субпродукты, рыбу, креветки, яйца, яичный порошок, мед и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания метаболитов нитрофуранов.

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

- в сухом молоке – 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 3, 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 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 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2493–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9293–74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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 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 5725–6–2002 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 методикой измерений 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 метаболитов нитрофуранов 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 наборов реагентов MaxSignal®

Метаболиты нитрофуранов	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 , %, $k=2$, $P=95$ %
AMOZ	от 0,20 до 12,80 включ.	6,3	7,5	8,0	16,0
AOZ	от 0,10 до 3,24 включ.	6,0	6,8	7,0	14,0
AND	от 0,20 до 12,80 включ.	6,3	8,0	8,0	16,0

Метаболиты нитрофуранов	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относи- тельное стандартное отклонение повтора- емости σ_r , %	Относи- тельное стандартное отклонение промежу- точной прецизион- ности $\sigma_{I(TO)}$, %	Относи- тельная стандартная неопреде- ленность u , %	Относи- тельная расширенная неопреде- ленность U , %, $k=2$, $P=95$ %
SEM	от 0,20 до 12,80 включ.	6,4	7,4	8,0	16,0

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 должна быть не 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 2,2 см³, 15 см³), а также охлаждение до плюс 10 °C, например, CR4000R, производства Centurion Scientific, Великобритания;
- лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, например, MSV-3500, производства BioSan Ltd., Латвия;
- гомогенизатор лабораторный типа ULTRA-TURRAX производства IKA® WerkeGmbH & Co. KG, Германия, например, Ultra Turrax DI 25 Digital или бытовой блендер;
- лабораторный термостат (инкубатор), обеспечивающий поддержание



температуры $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$, например, IC-101, производства Yamato Scientific, Япония;

- роторный испаритель в комплекте с водяной баней, обеспечивающей поддержание температуры $(60 \pm 5) ^\circ\text{C}$, например, Plei-VAP Value/GI, производства Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Германия;

- баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры $(60 \pm 5) ^\circ\text{C}$, $(80 \pm 5) ^\circ\text{C}$, например, WB-4MS производства BioSan Ltd, Латвия;

- холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс $2 ^\circ\text{C}$ до плюс $8 ^\circ\text{C}$ в холодильной камере и не более минус $18 ^\circ\text{C}$ в морозильной камере;

- секундомер или таймер, например, секундомер электронный «Интеграл С-01» по [5], 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 плюс $20 ^\circ\text{C}$ до плюс $25 ^\circ\text{C}$ с точностью не менее $1 ^\circ\text{C}$, 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 2 см³, 15 см³ и 50 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, 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;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода деионизированная;
- н-гексан ч.д.а. по [4];
- калий фосфорнокислый двузамещенный трехводный ч.д.а. по ГОСТ 2493;

- этилацетат ч.д.а. по ГОСТ 22300;
- натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328;
- кислота соляная ч.д.а. по ГОСТ 3118;
- азот газообразный повышенной чистоты по ГОСТ 9293;
- лабораторный детергент, например, Triton X-100;
- набор реагентов MaxSignal[®] для определения метаболитов нитрофуранов (MaxSignal[®] Furaltadone (AMAZ) ELISA Test Kit, MaxSignal[®] Nitrofurazone (SEM) ELISA Test Kit, MaxSignal[®] Furazolidone (AOZ) ELISA Test Kit, MaxSignal[®] Nitrofurantoin (AHD) ELISA Test Kit), производства PerkinElmer (США), состоящий из реактивов и микротитровального планшета, необходимых для выполнения измерений по определению содержания метаболитов нитрофуранов 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 специфичными антителами)	1 шт.
Градуировочные растворы 1 - 6 с концентрацией: AMAZ, AHD, SEM - 0,000; 0,025; 0,100; 0,400; 1,600; 6,400 нг/см ³ ; AOZ - 0,000; 0,020; 0,060; 0,180; 0,540; 1,620 нг/см ³	6 шт. по 1,8 см ³



Компонент набора	Количество в комплекте
Spike-раствор с концентрацией 10 нг/см ³ для внесения добавок	1,8 см ³
Конъюгат с пероксидазой хрена: AMoZ-HRP, AOZ-HRP, AND-HRP, SEM-HRP	8 см ³
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Стоп-реагент	14 см ³
Буфер для экстракции образцов (10× концентрат)	25 см ³
50 мМ раствор 2-нитробензальдегида	1,8 см ³
Буфер для доведения проб I	10 см ³
Буфер для доведения проб II	62 г

Следующие компоненты наборов 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;
- буфер для экстракции образцов (10× концентрат);
- 50 мМ раствор 2-нитробензальдегида.

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

5 Метод измерений

В процессе подготовки проб происходит экстракция метаболитов нитрофуранов AMOZ, AOZ, AND, SEM (аналит) с одновременным образованием их нитрофенильных производных. Подготовленные пробы используют для проведения иммуноферментного анализа.

В ходе анализа в лунки микротитровального планшета, сенсibilизированные специфичными антителами к аналиту, добавляются градуировочные растворы или подготовленные растворы проб и конъюгат аналита с пероксидазой хрена. Находящийся в растворе аналит конкурирует за центры связывания специфичных антител с конъюгированным аналитом, препятствуя связыванию последнего с антителами на стенках лунки.

После промывки в лунки добавляется раствор субстрата (тетраметилбензидин), и связанный конъюгат превращает его в окрашенный

продукт. Реакция окрашивания останавливается после внесения стоп-реагента. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Измеренная оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации аналита в пробе. Массовая доля метаболитов нитрофуранов в пробе определяется с использованием градуировочной зависимости, построенной по 6 градуировочным растворам.

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

6.1 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений массовой доли метаболитов нитрофуранов 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 1 М раствора гидроокиси натрия

Навеску гидроокиси натрия массой 4,00 г, взвешенную с погрешностью не более 0,01 г, помещают в стакан вместимостью 100 или 150 см³, растворяют в 30-50 см³ дистиллированной воды, раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой. Приготовленный раствор хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в плотно закрытой полиэтиленовой или фторопластовой посуде в течение 1 месяца.

10.2.2 Приготовление 1 М раствора соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 100 см³ наливают 50 - 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. При использовании кислоты другой плотности ее объем необходимо пересчитывать. Раствор хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С не более 1 месяца.

10.2.3 Приготовление 0,1 М раствора соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 100 см³ наливают 50 - 70 см³ дистиллированной воды, затем добавляют отмеренные пипеткой 10 см³ 1 М раствора соляной кислоты, приготовленного по п. 10.2.2. После перемешивания раствора доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С не более 1 месяца.

10.2.4 Приготовление 0,1 М раствора калия фосфорнокислого двузамещенного

Навеску калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного массой 2,28 г, взвешенную с погрешностью не более 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, перемешивают до полного растворения и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в закрытой посуде из химически стойкого стекла не более 1 месяца.

10.2.5 Приготовление буфера для экстракции образцов

В коническую колбу вместимостью 100 или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10× концентрата буфера для экстракции образцов, добавляют мерным цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной



аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор. Объем аликвоты концентрата V , см^3 , необходимый для приготовления буфера для экстракции образцов с учетом анализируемых образцов, рассчитывается по формуле

$$V = 0,1 \cdot N_{smp} + V_1 \quad (1)$$

где N_{smp} – количество анализируемых образцов в двух параллелях (по две навески из каждого образца);

V_1 – объем концентрата буфера для экстракции образцов, приготавливаемого в запас, см^3 (не менее $0,05 \text{ см}^3$).

Раствор используют свежеприготовленным.

10.2.6 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту $20 \times$ концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 см^3 переносят в коническую колбу вместимостью 250 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 °C до плюс 8 °C не более 6 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.

10.4 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 двух суток.

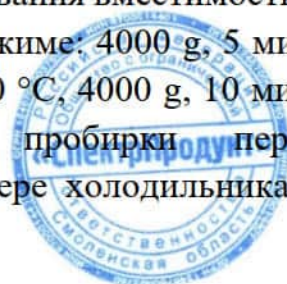
При необходимости длительного хранения образцы хранят в замороженном виде при температуре не выше минус 18 °С в течение 14 суток в упаковке, обеспечивающей отсутствие изменения массовой доли воды в образце. Перед проведением подготовки проб по п. 10.6 замороженные образцы должны быть разморожены при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

10.6 Подготовка проб

10.6.1 Получение экстрактов 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.

От образца с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Пробы молока центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин. Пробы сливок центрифугируют в следующем режиме: 10 °С, 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 °С до плюс 8 °С, контролируя температуру термометром. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности пробы после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

1 см³ обезжиренной пробы переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки вносят отобранные дозатором 0,5 см³ буфера для экстракции образцов, приготовленного по п. 10.2.5, 3,5 см³ дистиллированной воды, 0,5 см³ 1 М раствора соляной кислоты, приготовленного по п. 10.2.2, и 20 мм³ 50 мМ раствора 2-нитробензальдегида.

Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 30 секунд, после чего помещают в термостат (инкубатор) и инкубируют при температуре (60 ± 1) °С в течение 3 ч. Образец перемешивают после каждого часа инкубации в течение 30 секунд. После каждого перемешивания открывают и закрывают пробирку для избавления от образовавшегося газа.

После инкубации в пробирки, охлажденные до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, вносят отобранные дозатором 5 см³ 0,1 М раствора калия фосфорнокислого двузамещенного, приготовленного по п. 10.2.4, 0,4 см³ 1 М раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 10.2.1, и 6 см³ этилацетата.

Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 3 см³ и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 или 10 см³.

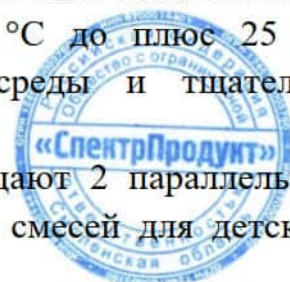
При невозможности получить указанный выше объем надосадочного слоя без примеси водной фазы, отбирают максимально возможный объем надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин, после чего повторно отбирают 3 см³ органического слоя.

Аликвоты экстрактов проб, отобранные в пробирки, используют для получения подготовленных растворов проб согласно п. 10.6.8.

10.6.2 Получение экстрактов 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.

В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 2 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.

Пробы восстановленного как описано выше образца используют для получения экстрактов проб по п. 10.6.1.

10.6.3 Получение экстрактов проб мяса, субпродуктов, рыбы, креветок

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, после чего гомогенизируют съедобные части с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки вносят отобранные дозатором 0,5 см³ буфера для экстракции образцов, приготовленного по п. 10.2.5, 3,5 см³ дистиллированной воды, 0,5 см³ 1 М раствора соляной кислоты, приготовленного по п. 10.2.2, и 20 мм³ 50 мМ раствора 2-нитробензальдегида.

Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 30 секунд, после чего помещают в термостат (инкубатор) и инкубируют при температуре (60 ± 1) °С в течение 3 ч. Образец перемешивают после каждого часа инкубации в течение 5 секунд. После каждого перемешивания открывают и закрывают пробирку для избавления от образовавшегося газа.

После инкубации в пробирки, охлажденные до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, вносят отобранные дозатором 5 см³ 0,1 М раствора калия фосфорнокислого двузамещенного, приготовленного по п. 10.2.4, 0,4 см³ 1 М раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 10.2.1, и 6 см³ этилацетата.

Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе в течение 30 секунд и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 3 см³ и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 или 10 см³.

При невозможности получить указанный выше объем надосадочного слоя без примеси водной фазы, отбирают максимально возможный объем надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин, после чего повторно отбирают 3 см³ органического слоя.

Если после центрифугирования образуется эмульсия и объем надосадочного слоя менее 3 см³, отбирают максимально возможный объем надосадочного слоя, пробирки нагревают на водяной бане при температуре $(80 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в течение 3 мин, после чего охлаждают до температуры от плюс 20 °C до плюс 25 °C, центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин, после чего повторно отбирают 3 см³ органического слоя.

Аликвоты экстрактов проб, отобранные в пробирки, используют для получения подготовленных растворов проб согласно п. 10.6.8.

10.6.4 Получение экстрактов 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 температуре окружающей среды.

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 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки вносят отобранные дозатором 0,5 см³ буфера для экстракции образцов, приготовленного по п. 10.2.5, 3,5 см³ дистиллированной воды, 0,5 см³ 1 М раствора соляной кислоты, приготовленного по п. 10.2.2, и 20 мм³ 50 мМ раствора 2-нитробензальдегида.

Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 30 секунд, после чего помещают в термостат (инкубатор) и инкубируют при температуре $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 3 ч. Образец перемешивают после каждого часа инкубации в течение 5 секунд. После каждого перемешивания открывают и закрывают пробирку для избавления от образовавшегося газа.

После инкубации в пробирки, охлажденные до температуры от плюс 20 °C до плюс 25 °C, вносят отобранные дозатором 5 см³ 0,1 М раствора калия

фосфорнокислого двузамещенного, приготовленного по п. 10.2.4, 0,4 см³ 1 М раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 10.2.1, и 6 см³ этилацетата.

Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе в течение 30 секунд и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 3 см³ и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ или 10 см³.

При невозможности получить указанный выше объем надосадочного слоя без примеси водной фазы, отбирают максимально возможный объем надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин, после чего повторно отбирают 3 см³ органического слоя.

Аликвоты экстрактов проб, отобранные в пробирки, используют для получения подготовленных растворов проб согласно п. 10.6.8.

10.6.5 Получение экстрактов 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 гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки вносят отобранные дозатором 0,5 см³ буфера для экстракции образцов, приготовленного по п. 10.2.5, 3,5 см³ дистиллированной воды, 0,5 см³ 1 М раствора соляной кислоты, приготовленного по п. 10.2.2, и 20 мм³ 50 мМ раствора 2-нитробензальдегида.

Содержимое пробирок перемешивают на вортексе до полного растворения меда, но не менее 1 мин, после чего помещают в термостат (инкубатор) и инкубируют при температуре (60 ± 1) °С в течение 3 ч. Образец перемешивают после каждого часа инкубации в течение 5 секунд. После каждого перемешивания открывают и закрывают пробирку для избавления от образовавшегося газа.

После инкубации в пробирки, охлажденные до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, вносят отобранные дозатором 5 см³ 0,1 М раствора калия фосфорнокислого двузамещенного, приготовленного по п. 10.2.4, 0,4 см³ 1 М раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 10.2.1, и 6 см³ этилацетата.

Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.



После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 3 см^3 и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 или 10 см^3 .

При невозможности получить указанный выше объем надосадочного слоя без примеси водной фазы, отбирают максимально возможный объем надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин, после чего повторно отбирают 3 см^3 органического слоя.

Аликвоты экстрактов проб, отобранные в пробирки, используют для получения подготовленных растворов проб согласно п. 10.6.8.

10.6.6 Получение экстрактов проб сгущенного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до плюс $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой $1,00\text{ г}$, взвешенные с точностью до $0,01\text{ г}$. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 . В пробирки вносят отобранные дозатором $0,5\text{ см}^3$ буфера для экстракции образцов, приготовленного по п. 10.2.5, $3,5\text{ см}^3$ дистиллированной воды, $0,5\text{ см}^3$ 1 М раствора соляной кислоты, приготовленного по п. 10.2.2, и 20 мм^3 50 мМ раствора 2-нитробензальдегида.

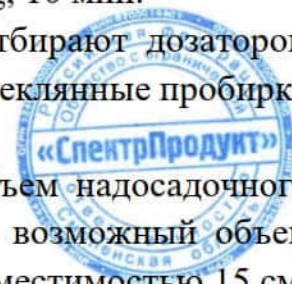
Содержимое пробирок перемешивают на вортексе до полного растворения сгущенного молока, но не менее 1 мин, после чего помещают в термостат (инкубатор) и инкубируют при температуре $(60 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 ч. Образец перемешивают после каждого часа инкубации в течение 5 секунд. После каждого перемешивания открывают и закрывают пробирку для избавления от образовавшегося газа.

После инкубации в пробирки, охлажденные до температуры от плюс $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до плюс $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, вносят отобранные дозатором 5 см^3 0,1 М раствора калия фосфорнокислого двузамещенного, приготовленного по п. 10.2.4, $0,4\text{ см}^3$ 1 М раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 10.2.1, и 6 см^3 этилацетата.

Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на вортексе в течение 30 секунд и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 3 см^3 и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3 .

При невозможности получить указанный выше объем надосадочного слоя без примеси водной фазы, отбирают максимально возможный объем надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3



и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин, после чего повторно отбирают 3 см³ органического слоя.

Аликвоты экстрактов проб, отобранные в пробирки, используют для получения подготовленных растворов проб согласно п. 10.6.8.

10.6.7 Подготовка холостой пробы

Для контроля чистоты реактивов и посуды проводят измерение подготовленного раствора холостой пробы (контроль холостой пробы). Контроль холостой пробы выполняется каждый раз при замене реактивов и посуды.

Подготовленный раствор холостой пробы получают в соответствии с п. 10.6.8, используя вместо экстрактов проб отмеренные дозатором 3 см³ этилацетата в пробирках вместимостью 5 см³ или 10 см³.

Для проведения измерений подготавливают две параллельные холостые пробы.

10.6.8 Получение подготовленных растворов проб

Экстракты проб в пробирках, полученные по п. 10.6.1 - 10.6.6, или экстракты холостой пробы, полученные по п. 10.6.7, выпаривают на ротаторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре $(60 \pm 5) ^\circ\text{C}$ досуха.

При подготовке проб молока, сливок, сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания к сухому остатку в пробирках добавляют отмеренные дозатором 1 см³ н-гексана и 1 см³ буфера для экстракции образцов, приготовленного по п. 10.2.5, после чего перемешивают содержимое на вортке в течение 2 мин, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 2,2 см³.

При подготовке остальных проб к сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 1 см³, перемешивают содержимое пробирок на вортке в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором 1 см³ буфера для экстракции образцов, приготовленного по п. 10.2.5, и перемешивают на вортке в течение 1 мин, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 2,2 см³.

Центрифугируют пробы в следующем режиме:

- 4000 g, 5 мин (пробы молока, сливок, сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания);
- 4000 g, 10 мин (остальные пробы).

После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой.



Примечание: При наличии в пробирке после выпаривания жидкого масла объем добавляемого н-гексана увеличивают до 3 см³, а центрифугирование происходит в пробирках вместимостью 15 см³.

Водные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 1 часа или в течение не более 2 суток в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

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 конъюгата с пероксидазой хрена 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.

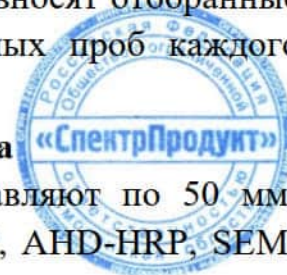
11.3 Процедура измерений

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 мм³ каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,000; 0,025; 0,100; 0,400; 1,600; 6,400 нг/см³ - AMOZ, AHD, SEM; 0,000; 0,020; 0,060; 0,180; 0,540; 1,620 нг/см³ - AOZ). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 100 мм³ двух параллельных проб каждого образца.

11.3.2 Добавление конъюгата с пероксидазой хрена

Во все лунки микротитровального планшета добавляют по 50 мм³ конъюгата с пероксидазой хрена (AMOZ-HRP, AOZ-HRP, AHD-HRP, SEM-HRP). 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 30 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 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 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.

11.3.6 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 метаболитов нитрофуранов

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 метаболитов нитрофуранов вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (3)$$

где B – оптическая плотность раствора;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией 0,000 нг/см³;

C – концентрация метаболита нитрофурана 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 метаболитов нитрофуранов в пробе рассчитывается по формуле (4), если при контроле холостой пробы согласно п. 12.3 выполняется условие (7). При невыполнении условия (7) массовая доля метаболита нитрофурана в пробе рассчитывается по формуле (5).

$$x = F * \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right) \quad (4)$$

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

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;



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

F – фактор разбавления пробы, равный двум.

12.2 Расчет окончательного результата измерений

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 14.2

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

где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой доли метаболита нитрофурана в параллельных пробах, мкг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до второго десятичного знака.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ} , равный

- для AMOZ, AHD, SEM - 0,20 мкг/кг;
- для AOZ - 0,10 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой доли метаболита нитрофурана в образце с использованием предела измерения согласно п. 13.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, равное:

- для AMOZ, AHD, SEM - 12,80 мкг/кг;
- для AOZ - 3,24 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой доли метаболита нитрофурана в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 13.2.

12.3 Контроль холостой пробы

Для контроля чистоты реактивов и посуды проводят измерение подготовленного раствора холостой пробы (контроль холостой пробы). Контроль холостой пробы выполняется каждый раз при замене реактивов и посуды.

В ходе контроля выполняют процедуру подготовки холостой пробы согласно п. 10.6.7. Проводят измерение подготовленных растворов холостой пробы согласно п. 11 и рассчитывают массовую долю метаболита нитрофурана в холостой пробе X_{BL} , мкг/кг, по формулам (4), (6).

Критерием применимости формулы (4) при расчете результата измерения согласно п. 12.1 является условие:

$$X_{BL} < X_L, \quad (7)$$

где X_L – норматив контроля холостой пробы, равный

- для AMOZ, AHD, SEM - 0,05 мкг/кг;



– для АОZ - 0,04 мкг/кг.

13 Форма представления результатов измерений

13.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(X)) \text{ мкг/кг} \quad (8)$$

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

где $\bar{X}$ – результат измерений, 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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (9)$$

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_{LO} , равный:

- для АМОZ, АНD, SEM - 0,20 мкг/кг;
- для АОZ - 0,10 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой доли метаболитов нитрофуранов в образце с использованием предела измерения в виде

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

где X_{LO} — значение предела измерений, приведенное выше.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , равное:

- для АМОZ, АНD, SEM - 12,80 мкг/кг;
- для АОZ - 3,24 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой доли метаболитов нитрофуранов 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, приведенное выше.

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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (10)$$

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

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (11)$$

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

r — относительное значение предела повторяемости, %, приведено в таблице 3.

При невыполнении условия (10) 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 $\overline{X}_1$, $\overline{X}_2$ 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 $\overline{X}_1$, $\overline{X}_2$,

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \quad (12)$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \leq CD_{abc}, \quad (13)$$

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

$$CD_{abc} = 0,01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \quad (14)$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 3, %.

При невыполнении условия (13) 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 $\overline{\overline{X}}$, мкг/кг, результатов измерений двух лабораторий $\overline{X}_1$, $\overline{X}_2$ соответственно

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \quad (15)$$

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

$$|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \leq CD_R, \quad (16)$$

то оба окончательных результата, полученные двумя лабораториями, считаются приемлемыми и общее среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по



формуле (15), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{X}, \quad (17)$$

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 3.

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

Таблица 3 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Метаболит нитрофурана	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
AMOU	18	17	16
AOZ	17	15	14
AHD	18	18	18
SEM	18	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 метаболитов нитрофуранов, а также естественно или искусственно контаминированных образцов, имеющих приписанное значение массовой доли метаболитов нитрофуранов (например, матричные стандартные образцы). Неопределенность приписанного значения массовой доли аналита в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

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

Оценка массовой доли метаболитов нитрофуранов 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 метаболитов нитрофуранов, соответствуют указанным выше условиям.

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

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (18)$$

где C_{ST} – концентрация метаболитов нитрофуранов в растворе, нг/см³;
 V_{ST} – объем добавляемого раствора метаболитов нитрофуранов, см³;
 m – масса навески пробы, г.

Примечание – принимается, что для сырого, пастеризованного, стерилизованного, ультрапастеризованного, восстановленного сухого молока, сливок, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания масса m численно равна объему аликвоты, см³.

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

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из индивидуальных метаболитов нитрофуранов в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Допускается использовать для внесения добавок готовые spike-растворы, 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 метаболитов нитрофуранов в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (19) при выполнении условия повторяемости по п. 14.2.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X}_K - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{X}_{am}, \quad (19)$$

где $K_{отн}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 3;

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



При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (19) 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 определяемого метаболита нитрофурана. Предварительно установленная массовая доля определяемого метаболита нитрофурана 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 определяемых метаболитов нитрофуранов 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

$$CL = d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (20)$$



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

Предупреждающие границы

$$UCL = D_2' \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (21)$$

Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (22)$$

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

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (23)$$

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

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N w_i / N}{d_2}, \quad (24)$$

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

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (25)$$

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 метаболитов нитрофуранов, по формуле

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (26)$$

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

X_{exp} – рассчитанное (приписанное) значение массовой доли метаболитов



нитрофуранов в пробе с добавкой, мкг/кг.

Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}, \quad (27)$$

Границы регулирования

$$UCL = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC}, \quad (28)$$

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

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}}. \quad (29)$$

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 (26), 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 2631-003-05807999-98 Реактивы. Н-гексан
- [5] 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 5725-6-2002 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
3	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		

