

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

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

№ 156/2026 от «07» августа 2026 г.

Методика (метод) измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® (свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 251/03-RA.RU.311703-2025 от 24.02.2025),

разработанная ООО «СпектрПродукт», Российская Федерация,

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

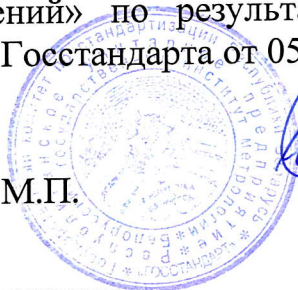
установленная в ФР.1.31.2025.50809 «Продукция животного происхождения. Методика измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal®» (МИ 1065-Б-2025) с изменением № 1,

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»**

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «СпектрПродукт»

А.Д. Юревич

«14» февраля 2025 г.



**ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ БЕТА-
ЛАКТАМОВ МЕТОДОМ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ MAXSIGNAL®
МИ 1065-Б-2025**

КОПИЯ
ВЕРНА

Экземпляр № 1

Передан ООО «ПионерПродукт»



Смоленск
2025



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

RA.RU.311703

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ

методики (метода) измерений
№ 251/03-RA.RU.311703-2025

массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов методом ИФА с использованием
наборов реагентов MaxSignal®
при необходимости указывают объект и метод измерения

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

регламентированной в документе «Продукция животного происхождения. Методика
измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов методом ИФА с
использованием наборов реагентов MaxSignal®» МИ 1065-Б-2025 утвержденном в феврале
2025 года на 40 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 методика измерений, теоретическое
или экспериментальное исследование методика 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

«24» февраля 2025 г.



**Приложение А
(обязательное)**

Показатели точности методики (метода) измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов 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 $\sigma_{I(TO)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k=2$, $P=95\%$
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, молоко сухое, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, масло сливочное, сыр, творог, творожные продукты, йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, мороженое, коктейли на молочной основе	от 1,00 до 6,00 включ.	3,0	5,2	7	14
Сгущенное молоко	от 2,50 до 24,0 включ.	3,3	6,8	9	18
Мед	от 3,00 до 60,0 включ.	3,3	5,7	8	16
Корма	от 2,00 до 60,00 включ.	3,0	5,4	7	14
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, яйца, яичный порошок	от 2,00 до 60,0 включ.	3,0	6,1	8	16

Заместитель директора Менделеевского филиала
ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест»

 А.А. Марутин

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«СПЕКТРПРОДУКТ»
ООО «СпектрПродукт»**



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «СпектрПродукт»

А.Д. Юревич

2026 г.

Извещение об изменении № 1

**ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ
МАССОВОЙ ДОЛИ АНТИБИОТИКОВ ГРУППЫ БЕТА-
ЛАКТАМОВ МЕТОДОМ ИФА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ MAXSIGNAL®
МИ 1065-Б-2025**

**КОПИЯ
ВЕРНА**



Экземпляр № 1

Передан ООО «ПионерПродукт»

Смоленск

2026

ООО «СпектрПродукт»		ИЗВЕЩЕНИЕ № 1		ОБОЗНАЧЕНИЕ ДОКУМЕНТА МИ 1065-Б-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 40 листах			
ИЗМ.	СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ				
1	Листы 2 - 40 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 «17» февраля 2025 г. Генеральным директором ООО «СпектрПродукт» А.Д. Юревичем

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «24» февраля 2025 г. № 251/03-RA.RU.311703-2025, выдано ФБУ «НИЦ ПМ-Ростест»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ ФР.1.31.2025.50809

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	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 пенициллина	14
10.2.2 Приготовление буфера для доведения проб	15
10.2.3 Приготовление промывочного раствора	16
10.3 Подготовка набора реагентов.....	16
10.3.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов.....	16
10.3.2 Подготовка микротитровального планшета	16
10.3.3 Приготовление основного раствора пенициллина с концентрацией 1000 нг/см ³	17
10.3.4 Приготовление основного раствора пенициллина с концентрацией 20 нг/см ³	17
10.3.6 Приготовление HPR-конъюгата антител № 2.....	18
10.3.7 Приготовление раствора белка, связывающего пенициллин	19
10.4 Требования к отбору образцов.....	19
10.5 Хранение образцов.....	19
10.6 Подготовка проб.....	19
10.6.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного, пастеризованного, ультрапастеризованного молока, сливок.....	19
10.6.2 Подготовка проб сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания.....	20
10.6.3 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны, варенца, простокваши, ряженки, айрана, пахты, ацидофилина и других кисломолочных продуктов.....	21
10.6.4 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога, творожных продуктов, мороженого, коктейлей на молочной основе	22
10.6.5 Подготовка проб сгущенного молока	22
10.6.6 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, рыбных консервов и пресервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы, креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров животных, яиц, яичного порошка	23
10.6.7 Подготовка проб меда.....	24
10.6.8 Подготовка проб корма.....	24
10.6.9 Получение растворов проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, рыбных консервов и пресервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы, креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров	



животных, яиц, яичного порошка, меда, корма с фактором разбавления, увеличенным по сравнению с указанным в инструкции к набору реагентов	25
11 Выполнение измерений	26
11.1 Общие требования	26
11.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно	26
11.3 Процедура измерений	26
11.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб	26
11.3.2 Добавление раствора белка, связывающего пенициллин	27
11.3.3 Инкубация	27
11.3.4 Промывка планшета	27
11.3.5 Добавление HPR-конъюгата антител № 2	27
11.3.6 Инкубация	27
11.3.7 Промывка планшета	28
11.3.8 Добавление ТМБ субстрата	28
11.3.9 Инкубация	28
11.3.10 Завершение реакции окрашивания	28
11.3.11 Измерение оптической плотности	28
12 Порядок обработки результатов измерений	28
12.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов в пробах	28
12.2 Действия при получении результата измерений оптической плотности проб меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с максимальной массовой концентрацией	30
12.3 Расчет окончательного результата измерений	30
13 Форма представления результатов измерений	31
13.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности	31
13.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли	31
14 Контроль точности результатов измерений	32
14.1 Периодичность проведения контроля точности	32
14.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	32
14.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	32
14.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости	33
14.5 Контроль правильности	35
14.5.1 Образцы для контроля правильности	35
14.5.2 Проведение контрольной процедуры	36
14.6 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)	36
14.6.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости	37
14.6.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности	38
Библиография	39
Приложение А	40



1 Вводная часть

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов (пенициллина (бензилпенициллина), ампициллина, азлоциллина, пиперациллина, нафциллина, амоксициллина, клоксациллина, оксациллина, цефоперазона, цефтиофура)* в указанной ниже продукции животного происхождения, в том числе сырье и кормах, методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов MaxSignal® для определения пенициллина, далее набор реагентов.

Область применения методики включает в себя следующие виды продукции: молоко (сырое, пастеризованное, ультрапастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сгущенное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, сливки, масло сливочное, сыр, йогурт, кефир, сметану, варенец, простоквашу, ряженку, айран, пахту, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, творог, творожные продукты, молочную сыворотку, восстановленную сухую молочную сыворотку, коктейли на молочной основе, мороженое, 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, продукты из рыбы, креветки, икру, яйца, яичный порошок, мед, корма и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания антибиотиков группы бета-лактамов.

Результаты измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов, 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 3, таблицы 1.

*Массовая доля антибиотиков группы бета-лактамов в соответствии с данной методикой определяется как сумма значений массовой доли указанных антибиотиков в пересчете на пенициллин с учетом перекрестной чувствительности, специфицируемой изготовителем набора реагентов.



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 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 28498–90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29169–91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

ГОСТ 29227–91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 30364.0-97 Продукты яичные. Методы отбора проб и органолептического анализа

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



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

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

ГОСТ Р ИСО 5725–6–2002 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 антибиотиков группы бета-лактамов 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 пенициллина

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 (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, молоко сухое, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, масло сливочное, сыр, творог, творожные продукты, йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, мороженое, коктейли на молочной основе	от 1,00 до 6,00 включ.	3,0	5,2	7	14
Сгущенное молоко	от 2,50 до 24,0 включ.	3,3	6,8	9	18
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и	от 2,00 до 60,0 включ.	3,0	6,1	8	16



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 , %, $k=2$, $P=95$ %
пресервы, яйца, яичный порошок					
Мед	от 3,00 до 60,0 включ.	3,3	5,7	8	16
Корма	от 2,00 до 60,00 включ.	3,0	5,4	7	14

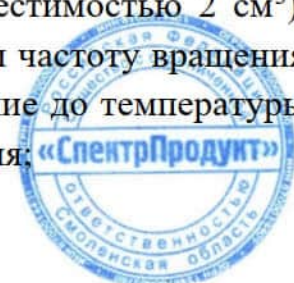
Указанные в таблице 1 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с:

- 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 см³), относительное центробежное ускорение не менее 4000 g и частоту вращения 4000 об/мин (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;
 - баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$, 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, Asura manual 825, Asura manual 835, Asura manual 855, производства Socorex ISBA S. A., Швейцария:
 - с диапазоном объемов дозирования от 10 до 100 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более 2,5 %;
 - с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более 1,5 %;
 - с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см^3 и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более 2,0 %;
 - многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм^3 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 мм^3 , например, 3D-IW8, производства BioSan Ltd., Латвия.
 - пробирки для центрифугирования из полипропилена вместимостью 2 см^3 и 15 см^3 ;



- 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-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 6709 или вода деионизированная;
- н-гексан ч.д.а. по [4];
- лабораторный детергент, например, Triton X-100;
- пенициллин с массовой долей основного вещества не менее 98 %;
- набор реагентов MaxSignal[®] для определения пенициллина (MaxSignal[®] Penicillin ELISA Test Kit), производства PerkinElmer (США), состоящий из реактивов и микротитровального планшета, необходимых для выполнения измерений по определению содержания антибиотиков группы бета-лактамов 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 пенициллином)	1 шт.
Основной стандарт пенициллина (бензилпенициллина, пенициллина G), массой 1000 нг (порошок) для приготовления градуировочных растворов и раствора для добавки (spike-раствора)	2 шт.
Флаконы для приготовления градуировочных растворов пенициллина с массовой концентрацией 0; 0,08; 0,20; 0,40	6 шт.



Компонент набора	Количество в комплекте
0,80; 1,20 нг/см ³	
Белок, связывающий пенициллин (10× концентрат)	1,8 см ³
Растворитель для белка, связывающего пенициллин	12 см ³
HPR-Конъюгат антител № 2 (200× концентрат)	0,1 см ³
Растворитель для антител №2	20 см ³
Экстракционный буфер для пенициллина (10× концентрат)	2 × 25 см ³
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 см ³
Стоп-реагент	14 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Буфер 1 для разбавления градуировочных растворов молока	15 см ³
Буфер для доведения проб (10× концентрат)	10 см ³

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

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

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

5 Метод измерений

Измерения массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов по настоящей методике выполняют методом, основанным на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого пенициллином, вместе с пробой добавляют белок высокоафинный к захвату бета-лактамов. Присутствующие в пробе антибиотики группы бета-лактамов конкурирует с пенициллином, прикрепленным к лункам планшета, за связывание с белком. После внесения вторичных антител, конъюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с белком, связанными с пенициллином на стенках лунки. После добавления ТМБ субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность растворов при 450 нм. Измеренная оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации пенициллина в градуировочном растворе и антибиотиков группы бета-лактамов в растворе пробы. Массовая доля

антибиотиков группы бета-лактамов в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

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

6.1 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов по настоящей методике соблюдают следующие требования:

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

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

6.2 Требования к квалификации персонала, выполняющего измерения

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

7 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

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

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

8 Требования к условиям инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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



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

9 Требования к условиям хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 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

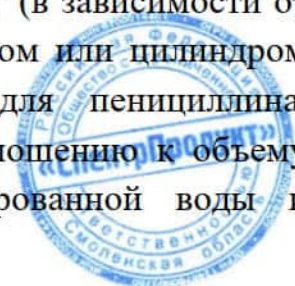
10.1 Подготовка лабораторной посуды

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 пенициллина

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



перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата экстракционного буфера для пенициллина рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{0,8N_1 + 8N_2 + 6N_3 + 18N_4 + 19,2N_5 + 10N_6 + V_1 + V_2}{10} \quad (1)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов молока, сливок, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, сухого молока, сгущенного молока;

N_2 – количество анализируемых образцов масла сливочного, сыра, творога, творожных продуктов, коктейлей на молочной основе, мороженого;

N_3 – количество анализируемых образцов молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны, варенца, простокваши, ряженки, айрана, пахты, ацидофилина и других кисломолочных продуктов;

N_4 – количество анализируемых образцов мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, рыбных консервов и пресервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы, креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров животных, яиц, яичного порошка;

N_5 – количество анализируемых образцов меда;

N_6 – количество анализируемых образцов корма;

V_1 – объем экстракционного буфера для пенициллина, используемого для приготовления градуировочных растворов пенициллина, см³ (5 см³).

V_2 – объем экстракционного буфера для пенициллина, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 1 см³).

Экстракционный буфер для пенициллина приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

10.2.2 Приготовление буфера для доведения проб

В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают дозатором аликвоту 10× концентрата буфера для доведения проб, добавляют цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата буфера для доведения проб рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{2N_3 + V_1}{10}, \quad (2)$$

где N_3 – количество анализируемых образцов молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны,



варенца, простокваши, ряженки, айрана, пахты, ацидофилина и других кисломолочных продуктов;

V_1 – объем буфера для доведения проб, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 0,5 см³).

Буфер для доведения проб приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

10.2.3 Приготовление промывочного раствора

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

$$N_w = 12 + 2N_{SMP}, \quad (3)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с п. 10.3.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов,



рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w . Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 9.

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

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

10.3.3 Приготовление основного раствора пенициллина с концентрацией 1000 нг/см³

К содержимому флакона с основным стандартом пенициллина добавляют отмеренные дозатором 1 см³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п.10.2.1. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 30 с. Полученный основной раствор пенициллина делят на аликвоты для приготовления в соответствии с п.10.3.4 раствора пенициллина с концентрацией 20 нг/см³, которые хранят при температуре не более минус 18 °С не более 1 месяца. Остатки аликвот после использования дальнейшему хранению не подлежат.

10.3.4 Приготовление основного раствора пенициллина с концентрацией 20 нг/см³

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см³ добавляют 0,98 см³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1, и 20 мм³ основного раствора пенициллина с концентрацией 1000 нг/см³, приготовленного по п. 10.3.3. Раствор перемешивают на вортексе в течение 30 с. Раствор приготавливается перед проведением анализа и хранения не подлежит.

10.3.5 Приготовление градуировочных растворов пенициллина

Градуировочные растворы пенициллина готовят путем последовательного разбавления основного раствора пенициллина с концентрацией 20 нг/см³, приготовленного по п. 10.3.4, следующим образом.

В соответствующий флакон для хранения градуировочных растворов вносят аликвоту раствора пенициллина и аликвоту растворителя для приготовления градуировочных растворов. Раствор пенициллина, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот раствора и растворителя, используемые для приготовления градуировочных растворов, указаны в таблице 3. В качестве растворителя используется:



– для проб молока – рекомендуется использовать буфер 1 для разбавления градуировочных растворов молока;

– для всех остальных проб - экстракционный буфер для пенициллина, приготовленный по п. 10.2.1.

Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 30 с. Полученные градуировочные растворы пенициллина хранению не подлежат и должны быть использованы в течение дня. После использования остатки градуировочных растворов должны быть удалены из флаконов, подлежащих хранению. Пустые флаконы должны храниться в составе набора реагентов в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С и использоваться при последующем приготовлении градуировочных растворов.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов

Номер град. раствора	Массовая концентрация градуировочного раствора, нг/см ³	Источник аликвоты раствора пенициллина для приготовления градуировочного раствора	Объем аликвоты раствора пенициллина, мм ³	Объем растворителя для приготовления градуировочных растворов, мм ³
6	1,20	основной раствор с концентрацией 20 нг/см ³	60	940
5	0,80	град, раствор № 6	500	250
4	0,40	град, раствор № 5	500	500
3	0,20	град, раствор № 4	500	500
2	0,08	град, раствор № 3	500	750
1	0,00	-	-	500

10.3.6 Приготовление HPR-конъюгата антител № 2

В стеклянную пробирку вместимостью 5 или 10 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата HPR-конъюгата антител № 2 объемом не менее 10 мм³, добавляют дозатором в 199 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для антител № 2. Содержимое пробирки тщательно перемешивают путем вращения или переворачивания закрытой пробирки.

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

$$V = \frac{150N_w + V_1}{200}, \quad (4)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых



при проведении измерений, рассчитывается по п. 10.3.2;

V_I – объем НРР-конъюгата антител № 2, приготавливаемого в запас, мм³ (не менее 200 мм³).

НРР-конъюгат антител № 2 приготавливается непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

10.3.7 Приготовление раствора белка, связывающего пенициллин

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см³ отбирают дозатором аликвоту 10×концентрата белка, связывающего пенициллин, добавляют дозатором в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для белка, связывающего пенициллин. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения закрытой пробирки.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле

$$V = \frac{100N_w + V_1}{10}, \quad (5)$$

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

V_I – объем раствора белка, связывающего пенициллин, приготавливаемого в запас, мм³ (не менее 100 мм³).

Раствор белка, связывающего пенициллин, приготавливается непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

10.4 Требования к отбору образцов

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

10.5 Хранение образцов

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

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

10.6 Подготовка проб

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

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с



п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

Образец переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³ в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

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, 10 мин. Пробы сливок центрифугируют в следующем режиме: плюс 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.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренной пробы объемом 100 мм³ и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

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

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

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

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



От восстановленного как описано выше образца с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см^3 и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 . Центрифугируют пробы в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. 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.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренной пробы объемом 100 мм^3 и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см^3 . В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1, и тщательно перемешивают содержимое на вортке.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C в течение 2 часов.

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

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 и тщательно перемешивают.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 2 параллельные навески образца массой $6,25 \text{ г}$, взвешенные с погрешностью не более $0,01 \text{ г}$. К навеске приливают небольшими порциями по $10\text{-}20 \text{ см}^3$ дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

При наличии в образце йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают. Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой $1,00 \text{ г}$, взвешенные с погрешностью не более $0,01 \text{ г}$, и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 . В пробирки с пробами добавляют отмеренные дозатором 1 см^3 буфера для доведения проб, приготовленного по п. 10.2.2, 3 см^3 экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1, и перемешивают на вортке в течение 30 с на максимальной скорости.



Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см³ из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

10.6.4 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога, творожных продуктов, мороженого, коктейлей на молочной основе

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Образец масла, охлажденный до температуры не более минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Образец творога, творожного продукта тщательно перетирают в ступке, предварительно отделив и отбросив твердые немолочные компоненты, при их наличии. От образцов мороженого предварительно удаляют шоколадную глазурь, вафельную оболочку и другие отделяемые немолочные компоненты. При наличии в образце коктейлей частиц твердой консистенции их отбрасывают. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 4 см³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1. Пробирки с пробами (кроме мороженого и коктейлей на молочной основе) выдерживают на водяной бане при температуре (50±2) °С до расплавления пробы, но не менее двух минут.

Затем пробирки с пробами интенсивно встряхивают на шейкере или вручную в течение 5 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см³ из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира, и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

10.6.5 Подготовка проб сгущенного молока

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 отбирают две параллельные навески массой 25,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г. Навески помещают в мерные колбы вместимостью 100 см³ и приливают отмеренную с помощью пипетки или дозатора дистиллированную воду порциями по 10-20 см³, нагретую до температуры плюс 40 °С. Перемешивают содержимое колб вращением до полного растворения навески. После охлаждения до температуры окружающей среды растворы в колбах доводят до метки дистиллированной водой. Из каждой колбы отбирают с помощью дозатора аликвоты объемом 10 см³ и помещают в пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см³.

Пробирки с аликвотами центрифугируют в следующем режиме: плюс 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.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм³ и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

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

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.

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 погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 9 см³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1. Пробирки интенсивно встряхивают на вортексе в течение 3 мин или при переворачивании на ротаторе в течение 20 мин. Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см³ из надосадочного слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и частиц осадка, и переносят их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором н-гексан объемом 2 см³, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 2 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

Дозатором удаляют верхний слой жира. Для анализа используют надосадочный слой, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и частиц осадка.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

10.6.7 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 10.4. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают. От образца меда отбирают две параллельные навески массой 0,40 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки с закручивающимися крышками вместимостью от 15 до 50 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки и/или дозатора 9,6 см³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1. Содержимое пробирок растворяют путем интенсивного встряхивания на шейкере в течение 10 мин.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

10.6.8 Подготовка проб корма

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



перемешивают.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 5 см³ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 10.2.1. Пробирки интенсивно встряхивают на вортексе в течение 3 мин или при переворачивании на ротаторе в течение 20 мин. Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см³ из надосадочного слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и частиц осадка, и переносят их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором н-гексан объемом 2 см³, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 2 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин.

Дозатором удаляют верхний слой жира. Для анализа используют надосадочный слой, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и частиц осадка.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

10.6.9 Получение растворов проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, консервов мясных и мясорастительных, полуфабрикатов мясных и мясорастительных, рыбных консервов и пресервов, субпродуктов, рыбы, продуктов из рыбы, креветок, икры, сала, в т.ч. шпика, жиров животных, яиц, яичного порошка, меда, корма с фактором разбавления, увеличенным по сравнению с указанным в инструкции к набору реагентов

Если при проведении измерений в соответствии с разделом 11 полученные значения оптической плотности проб меньше, чем оптическая плотность градуировочного раствора с концентрацией пенициллина (1,20 нг/см³), то в случаях, указанных в п. 12.2, проводят разбавление приготовленных по п. 10.6.6, 10.6.7 и 10.6.8 растворов проб экстракционным буфером для пенициллина, приготовленным по п. 10.2.1.

Разбавлению должны подвергаться свежеприготовленные растворы проб.

При проведении разбавления отобранные дозатором аликвоты растворов проб объемом V_a , мм³, переносят в пробирки вместимостью от 1 до 5 см³. В пробирки добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер



для пенициллина, приготовленный по п. 10.2.1, объемом V_6 , мм³, и перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Коэффициент разбавления K рассчитывается по формуле

$$K = \frac{V_a + V_6}{V_a}, \quad (6)$$

Величины V_a и V_6 должны соответствовать условию (7), и выбираются таким образом, чтобы концентрация пенициллина в разбавленном растворе пробы находилась в диапазоне градуировки.

$$500 \leq (V_a + V_6) \leq 1000 \quad (7)$$

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 2 часов.

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 белка, связывающего пенициллин по п. 11.3.2, HPR-конъюгата антител № 2 по п. 11.3.5, ТМБ субстрата по п. 11.3.8, стоп-реагента по п. 11.3.10 проводят с использованием многоканального дозатора. Отбор указанных выше реагентов многоканальным дозатором производят из предварительно наполненных отбираемым раствором одноразовых ванночек для реагентов.

При этом не допускается:

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

11.3 Процедура измерений

11.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 10.3.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 50 мм³ каждого градуировочного раствора, приготовленного согласно п. 10.3.5. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00; 0,08; 0,20; 0,40; 0,80; 1,20 нг/см³). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 50 мм³ двух

параллельных проб каждого образца.

11.3.2 Добавление раствора белка, связывающего пенициллин

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 100 мм³ раствора белка, связывающего пенициллин, приготовленного по п. 10.3.7. 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. 10.2.3 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 HPR-конъюгата антител № 2

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором по 150 мм³ HPR-конъюгата антител № 2, приготовленного по п. 10.3.6. Перемешивают содержимое лунок аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола или покачивая планшет в руке в течение 1 мин.

11.3.6 Инкубация

Помещают микротитровальный планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 8.



11.3.7 Промывка планшета

Промывают планшет в соответствии с п. 11.3.4.

11.3.8 Добавление ТМБ субстрата

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

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

11.3.9 Инкубация

Помещают микротитровальный планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 15 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 8.

11.3.10 Завершение реакции окрашивания

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

11.3.11 Измерение оптической плотности

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

12 Порядок обработки результатов измерений

12.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов 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 пенициллина вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (8)$$



где B – оптическая плотность раствора пенициллина;

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

C – концентрация пенициллина в растворе, нг/см³;

a, b – коэффициенты линейной регрессии.

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

Массовая доля антибиотиков группы бета-лактамов в пробе рассчитывается по следующей формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x - a}{b}\right), \quad (9)$$

где X – массовая доля антибиотиков группы бета-лактамов в пробе, мкг/кг;

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблице 4.

Таблица 4 – Факторы разбавления

Виды продукции	Фактор разбавления
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, масло сливочное, сыр, творог, творожные продукты, коктейли на молочной основе, мороженое, корма	5
Сгущенное молоко	20
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, яйца, яичный порошок	10
Мед	25



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

При получении хотя бы одного из результатов измерений оптической плотности параллельных проб продукции, указанной в п. 10.6.9, для которых не проводилось дополнительное разбавление по п. 10.6.9, меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией пенициллина 1,20 нг/см³, производят действия в соответствии с п. 10.6.9, после чего повторяют измерения согласно разделу 11. Массовая доля антибиотиков группы бета-лактамов в таких пробах рассчитывается по формуле (9) с использованием в качестве фактора разбавления значение величины F' , рассчитываемой по формуле

$$F' = F \cdot K, \quad (10)$$

где K – коэффициент разбавления, рассчитываемый по формуле (6);

F – значение фактора разбавления, приведенное в таблице 4.

12.3 Расчет окончательного результата измерений

Рассчитывают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (11)$$

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

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

Если рассчитанное значение $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 3, то вместо окончательного результата измерений выдают одностороннюю оценку массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений согласно п. 13.2.

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



13 Форма представления результатов измерений

13.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(X)) \text{ мкг/кг} \quad (12)$$

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

где $\bar{X}$ – результат измерений массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов, 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

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

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

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

13.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли

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

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

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

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , указанное в разделе 3, то дается односторонняя оценка массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов 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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (14)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (11).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (15)$$

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 (14) 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 $\overline{X}_1$, $\overline{X}_2$,

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \quad (16)$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \leq CD_{abc}, \quad (17)$$

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

$$CD_{abc} = 0,01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \quad (18)$$

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

При невыполнении условия (17) 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

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \quad (19)$$

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,

$$|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \leq CD_R, \quad (20)$$

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

формуле (19), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{X}, \quad (21)$$

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

k – коэффициент, равный 1,4;

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

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

Таблица 5 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана, варенец, простокваша, ряженка, айран, пахта, ацидофилин и другие кисломолочные продукты, масло сливочное, сыр, творог, творожные продукты, мороженое, коктейли на молочной основе	9	14	14
Сгущенное молоко	9	18	18
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты, рыба, продукты из рыбы, креветки, икра, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, яйца, яичный порошок	9	17	
Мед	9	15	15
Корма	8	15	15



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 анализа (рабочая проба с добавкой). Контроль правильности проводится с использованием добавок пенициллина, а также естественно или искусственно загрязненных образцов, имеющих присвоенное значение массовой доли пенициллина (например, матричные стандартные образцы). Неопределенность присвоенного значения массовой доли пенициллина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

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

Оценка массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов в образцах без добавки должна быть менее предела измерения данной методики. Она рассчитывается по формуле (11) 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 присвоенное изготовителем значение массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов, соответствуют указанным выше условиям.

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

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (19)$$

где C_{ST} – концентрация пенициллина в растворе, нг/см³;
 V_{ST} – объем добавляемого раствора пенициллина, 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 пенициллина в пробе с добавкой должна



находиться в диапазоне измерений.

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

14.5.2 Проведение контрольной процедуры

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

За результат контрольного измерения, $\overline{X}_K$, принимают результат измерения массовой доли антибиотиков группы бета-лактамов в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (19) при выполнении условия повторяемости по п. 14.2.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X}_K - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{X}_{am}, \quad (20)$$

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

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

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (20) 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 пенициллина. Предварительно установленная массовая доля антибиотиков группы бета-лактамов 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 пенициллина 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

$$CL = d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (21)$$

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

d_2 – коэффициент, равный 1,128.

Предупреждающие границы

$$UCL = D_2' \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (22)$$

Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (23)$$

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

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (24)$$

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



$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N w_i / N}{d_2}, \quad (25)$$

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

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (26)$$

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 пенициллина, по формуле

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (27)$$

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

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

Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}, \quad (28)$$

Границы регулирования

$$UCL = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC}, \quad (29)$$

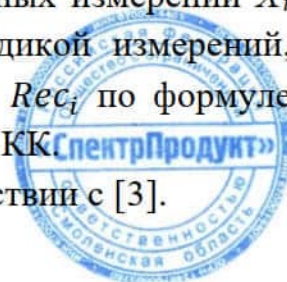
где S_{REC} – стандартное отклонение извлечения, %, рассчитываемое по формуле

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}}. \quad (30)$$

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 (27), 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		

