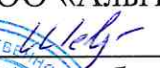


УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Альгимед»

 О.А. Шевченко
«21» ноября 2025 г.



ПРОДУКЦИЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.

**Методика измерений содержания антибиотиков группы тетрациклинов
методом ИФА с использованием набора реагентов «ИФА
антибиотик-тетрациклин»**

МИ 1016-2025

(МВИ.МН 3830-2015 с Изменениями 1, 2, 3)

(взамен МИ 1016-2018)

**Москва
2025**

ПРЕДИСЛОВИЕ

1 РАЗРАБОТАНА Обществом с ограниченной ответственностью «Альгимед»» (ООО «Альгимед»)

2 АТТЕСТОВАНА Федеральное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский центр прикладной метрологии – Ростест» (ФБУ «НИЦ ПМ – Ростест»)

3 УТВЕРЖДЕНА «21» ноября 2025 г. приказом Генерального директора «ООО «Альгимед»» № 29-ОД от 21.11.2025 г.

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «25» ноября 2025 г. № 1829/03-RA.RU.311703-2025 выдано ФБУ «НИЦ ПМ – Ростест»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ ФР.1.31.2025.52976

Содержание

1	Вводная часть	6
1.1	Назначение и область применения методики измерений.....	6
2	Нормативные ссылки.....	7
3	Требования к показателям точности измерений	8
4	Требования к средствам измерений, испытательному оборудованию, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, посуде.....	11
4.1	Средства измерений, испытательное оборудование и вспомогательные устройства.....	11
4.2	Материалы, реактивы, посуда	13
5	Метод измерений	14
6	Требования безопасности и требования к квалификации операторов.....	15
6.1	Общие требования безопасности и охраны окружающей среды	15
6.2	Требования к квалификации операторов	15
7	Условия выполнения измерений	15
7.1	Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении	15
7.2	Условия хранения набора реагентов	16
8	Подготовка к выполнению измерений	16
8.1	Отбор образцов и хранение	16
8.2	Подготовка лабораторной посуды	17
8.3	Приготовление растворов	17
8.3.1	Приготовление экстракционного буферного раствора.....	17
8.3.2	Приготовление буферного раствора для разбавления проб	17
8.3.3	Приготовление буферного раствора для доведения проб	18
8.4	Подготовка набора реагентов.....	18
8.4.1	Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов	18
8.4.2	Подготовка микротитровального планшета	18
8.4.3	Приготовление промывочного раствора	19
8.4.4	Приготовление основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/см ³	19
8.4.5	Приготовление градуировочных растворов тетрациклина	20
8.5	Подготовка проб	20

8.5.1 Подготовка проб молока (кроме сухого), сливок, десертов на молочной основе, молочной сыворотки, кисломолочных продуктов, творожных продуктов, коктейлей на молочной основе, пахты	20
8.5.2 Подготовка проб сухого молока, сухой молочной сыворотки, сухих молочных смесей для детского питания	21
8.5.3 Подготовка проб яиц, яичного порошка, сыра, меда, сгущенного молока, мороженого на молочной основе	22
8.5.4 Подготовка проб сливочного масла.....	23
8.5.5 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, сала, в т.ч. шпика, рыбы, рыбной продукции, креветок, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных, жира животного	24
8.5.6 Получение растворов проб с увеличенным фактором разбавления.....	24
9 Выполнение измерений.....	25
9.1 Общие требования	25
9.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно .	25
9.3 Процедура измерений.....	25
10 Обработка результатов измерения	27
10.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов	27
10.2 Действия при получении результата измерений оптической плотности проб меньше оптической плотности градуировочного раствора с максимальной массовой концентрацией.....	28
10.3 Расчет окончательного результата измерений	29
11 Форма представления результатов измерений	29
11.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности	29
11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов	30
12 Контроль точности результатов измерений.....	30
12.1 Периодичность проведения контроля точности.....	30
12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	30
12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	31
12.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.....	31

12.5 Контроль правильности	33
12.5.1 Образцы для контроля правильности	33
12.5.2 Проведение контрольной процедуры	34
12.6 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК).....	35
12.6.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости	35
12.6.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности.....	36
Библиография	37

1 Вводная часть

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее – методика) массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов¹ в указанной ниже продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин», производства ООО «Альгимед Техно», (далее – набор реагентов).

Область применения методики включает в себя:

– Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, масло сливочное, сыр, кисломолочную продукцию (творог, йогурт, кефир, сметану), молочную сыворотку, сухую молочную сыворотку, мясо, готовую к употреблению мясную продукцию, рыбу, креветки, яйца, мед;

– Молоко ультрапастеризованное, десерты на молочной основе (в т.ч. йогуртные), пахта, сливки, сухая молочная смесь для детского питания, кисломолочная продукция (ряженка, айран, простокваша, варенец, ацидофилин с наполнителями и без), творожная продукция (в том числе творожные сырки, зерненный творог, творожная масса, творожная паста и подобная продукция с наполнителями и без), сало в т.ч. шпик, жиры животные, переработанная и непереработанная пищевая рыбная продукция животного происхождения, в т.ч. для детского питания (кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, рыбные консервы и пресервы, икра, варено-мороженая пищевая рыбная продукция), субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, яичный порошок.

Результаты измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов, 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 её 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, таблица 1.

Настоящая методика может применяться в испытательных лабораториях любой принадлежности для испытания пищевой продукции и сырья животного происхождения согласно области применения с целью определения массовой доли антибиотиков тетрациклиновой группы, в том числе в следующий областях (включая, но не ограничиваясь):

¹ Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в соответствии с данной методикой определяется как сумма значений массовой доли следующих антибиотиков (их эпимеров) в пересчете на тетрациклин с учетом перекрестной чувствительности, специфицируемой изготовителем набора реагентов: Тетрациклина, хлортетрациклина, доксициклина, демеклоциклина, окситетрациклина, 4-эпитетрациклина, 4-эпихлортетрациклина, 4-эпиокситетрациклина при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин»

- обеспечение защиты жизни и охраны здоровья человека;
 - проведение испытаний при осуществлении контроля за соответствием продукции и сырья животного происхождения требованиям законодательства;
 - проведение лабораторных исследований.
- Методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие нормативные документы:

- СТБ 1036–97 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности (действующий в РФ аналогичный документ: ГОСТ 34668–2020 Продукция пищевая. Методы отбора и подготовка образцов (проб) для определения показателей безопасности);
- СТБ ISO 5725–2–2022 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений (действующий в РФ аналогичный документ ГОСТ Р ИСО 5725–2–2022)
- СТБ ИСО 5725–6–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике (действующий в РФ аналогичный документ ГОСТ Р ИСО 5725–6–2002);
- СТБ ISO 21748–2019 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерений (действующий в РФ аналогичный документ ГОСТ Р ИСО 21748–2021 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений);
- 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 Весы лабораторные. Общие технические требования;
- ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;
- ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия (действующий в РФ аналогичный документ: ГОСТ Р 58144–2018 Вода дистиллированная. Технические условия);
- ГОСТ 9147–80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия;
- ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия;

- ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
- ГОСТ 28498–90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний;
- ГОСТ 29227–91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.
- ГОСТ 30364.0–97 Продукты яичные. Методы отбора проб и органолептического анализа (действующий в РФ вместо указанного нормативный документ – ГОСТ 31720–2012 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. 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.

Примечание – При пользовании настоящей методикой измерений целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов с помощью соответствующих правовых справочных систем в глобальной компьютерной сети Интернет или уточнить статус непосредственно у разработчика и держателя нормативного документа или его правопреемника. Если ссылочный нормативный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящей рекомендацией следует руководствоваться заменяющим (измененным) документом. Если ссылочный нормативный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Требования к показателям точности измерений

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

В результате оценки показателя 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 2.

Эксперименты по оцениванию метрологических характеристик методики были проведены в 2013, 2014, 2015, 2020 годах в лаборатории химии пищевых продуктов лаборатории микробиологии ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены», лаборатории санитарно-химических и токсикологических методов исследований ГУ «ГРГЭ и ОЗ», г. Минск.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин»

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(PO)}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, кисломолочная продукция (ряженка, айран, простокваша, творог, кефир, ацидофилин с наполнителями и без), творожные продукты (в том числе творожные сырки, зерненный творог, творожная масса, творожная паста и подобные продукты с наполнителями и без)	От 1,00 до 80,00 включ.	4,9	6,6
Десерты на молочной основе, коктейли на молочной основе (в т.ч. йогуртные), пахта, кисломолочная продукция (йогурт, варенец, сметана), молоко сухое, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка, сухая молочная смесь для детского питания, сыр, сгущенное молоко, мороженое на молочной основе, яйца, яичный порошок		7,7	8,2
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, сало в т.ч. шпик, жиры животные, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, икра		6,5	7,4
Переработанная и непереработанная пищевая рыбная продукция животного происхождения, в т.ч. для детского питания (рыбы, кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция), креветки		9,5	9,5
Мед		7,7	8,2
Масло сливочное	От 3,00 до 160,00 включ.	9,5	9,5

Таблица 2 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с методикой при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин»

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , % $k=2$, $P=95\%$
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, кисломолочная продукция (ряженка, айран, простокваша, творог, кефир, ацидофилин с наполнителями и без), творожные продукты (в том числе творожные сырки, зерненный творог, творожная масса, творожная паста и подобные продукты с наполнителями и без)	От 1,00 до 80,00 включ.	8	16
Десерты на молочной основе, коктейли на молочной основе (в т.ч. йогуртные), пахта, кисломолочная продукция (йогурт, варенец, сметана), молоко сухое, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка, сухая молочная смесь для детского питания, сыр, сгущенное молоко, мороженое на молочной основе, яйца, яичный порошок		9	18
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, сало в т.ч. шпик, жиры животные, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, икра		8	16
Переработанная и непереработанная пищевая рыбная продукция животного происхождения, в т.ч. для детского питания (рыбы, кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция), креветки		10	20
Мед	От 3,00 до 80,00 включ.	9	18
Масло сливочное	От 3,00 до 160,00 включ.	10	20

Указанные в таблицах 1-2 показатели точности получены на основании данных эксперимента, проведенного в соответствии с:

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

При исследовании избирательности оценена перекрестная реактивность по отношению к различным антибиотикам группы тетрациклинов.

Перекрестная реактивность составила, в пересчете на тетрациклин:

для хлортетрациклина – 80 %, для доксициклина – 38 %, для демеклоциклина – 67 %, для окситетрациклина – 52 %, 4-эпитетрациклин гидрохлорида – 39 %, 4-эпихлортетрациклин гидрохлорида – 42 %, 4-эпиокситетрациклина – 44 %.

4 Требования к средствам измерений, испытательному оборудованию, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, посуде

4.1 Средства измерений, испытательное оборудование и вспомогательные устройства

Весы электронные 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 (пределы допускаемой погрешности измерений оптической плотности более $\pm 5\%$), например, EMax Plus, производства Molecular Devices LLC, США.

Шаблон для обработки результатов измерений средствами Microsoft® Office Excel версии не ниже 8.0 «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-тетрациклин», разработанный ООО «Альгимед Техно» при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин».

Термометр лабораторный частичного погружения класса точности 1 с ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498.

Секундомер электронный «Интеграл С-01» по [2], производства ОАО «Интеграл» - управляющая компания холдинга «Интеграл», Республика Беларусь.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g, (пробирки вместимостью 2 см³), относительное центробежное ускорение не менее 4000 g и частоту вращения 4000 об/мин (пробирки вместимостью 15 см³), например, Rotofix 32A, производства Hettich Lab Technology Aps, Германия.

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 18 °С в морозильной камере.

Лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, например, MSV-3500, производства BioSanLtd, Латвия.

Лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин, например, термошейкер PST-60HL, производства BioSanLtd, Латвия.

Гомогенизатор лабораторный типа ULTRA-TURRAX производства IKA® Werke GmbH & Co. KG (Германия), например Ultra Turrax DI 25 Digital или бытовой блендер.

pH-метр с диапазоном измерений от 0 до 14 pH и погрешностью $\pm 0,1$ pH в комплекте с электродами, например pH-221 производства HANNA instruments®, Inc., США.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от плюс 70 °C до плюс 75 °C, ± 1 °C;

Дозаторы пипеточные (далее – дозаторы) 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 $\pm 2,5$ %;

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

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

- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5$ %.

Средства измерений для контроля условий окружающей среды:

- температура воздуха с диапазоном измерений, включающим диапазон от плюс 15 °C до плюс 25 °C, и пределами погрешности измерений не более ± 1 °C;

- относительной влажности воздуха с диапазоном измерений, включающем диапазон от 15 % до 80 % и пределами относительной погрешности измерений не более ± 3 %.

Средства измерения для контроля температуры образцов с диапазоном измерений, включающим диапазон от плюс 18 °C до плюс 25 °C и пределами погрешности измерений не более ± 1 °C.

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

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °C до плюс 25 °C с погрешностью ± 1 °C, например, Thermomixer comfort производства Eppendorf AG, Германия в комплекте с термоблоком для микротитровальных планшетов;

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

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, испытательного оборудования с нормируемыми точностными характеристиками, вспомогательных устройств с техническими характеристиками не хуже указанных.

Для проведения работ, согласно настоящей методике, используют средства измерений, прошедшие метрологический контроль согласно порядку, установленному законодательством РФ.

4.2 Материалы, реактивы, посуда

Пленка «парафильм» или скотч.

Микрофибровые салфетки, например, Ultrafine 30x30. производства Marumi Optical Co. Ltd.

Бумага индикаторная с интервалом изменения рН от 5 до 8, например, индикаторная бумага лакмоидная синяя по [3].

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Шпатели пластиковые.

Штатив для пробирок.

Пипетки Пастера.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 см³.

Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 2 см³.

Пробирки стеклянные вместимостью см³ типа П-1-5-0,1 ХС, 10 см³ типа П-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770.

Пробирки стеклянные с закручивающимися крышками вместимостью от 15 до 50 см³.

Колбы мерные вместимостью 100 см³, 1000 см³ типа 2-100-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Колбы конические вместимостью 100, 250, 500 см³ по ГОСТ 25336.

Воронки типа В-56-80 ХС. В-75-110 ХС по ГОСТ 25336.

Стаканы Н-1 – 100 или Н-1 – 150 по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-1-1-5, 1-1-1-10 по ГОСТ 29336.

Цилиндры мерные вместимостью 10, 25, 100, 250 см³ типа 3 – 10 – 2, 3 – 25 – 2, 3 – 100 – 2, 3 – 250 – 2 по ГОСТ 1770.

Ступка и пестик фарфоровые по ГОСТ 9147.

вода, дистиллированная по ГОСТ 6709.

Моющее средство (детергент), не содержащее ферментных или ингибирующих добавок. Рекомендуются использовать лабораторный детергент, например, TritonX-100.

Набор реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» по [4], производства ООО «Альгимед Техно» (Республика Беларусь) – набор реактивов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению антибиотиков группы тетрациклинов методом иммуноферментного анализа в составе (таблица 3):

[5], производства ООО «Компания Альгимед» (Республика Беларусь) - набор реактивов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению концентрации антибиотиков группы тетрациклинов методом иммуноферментного анализа в составе (таблицы 5, 6).

Допускается использовать другие материалы, реактивы и посуду (кроме набора реагентов) с характеристиками и качеством не хуже указанных.

Таблица 3 – Состав наборов реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

Компонент набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых тетрациклином)	1 шт.
Основной стандарт тетрациклина массой 225 нг для приготовления градуировочных растворов	3 шт.
Флаконы для приготовления градуировочных растворов с концентрацией 0 нг/см ³ , 0,05 нг/см ³ , 0,15 нг/см ³ , 0,40 нг/см ³ , 0,80 нг/см ³ , 1,60 нг/см ³	6 шт.
Растворитель для приготовления градуировочных растворов	30 см ³
Раствор антител к тетрациклину	12 см ³
Конъюгат	16 см ³
5-ти кратный концентрат экстракционного буферного раствора	55 см ³
Концентрат буферного раствора для доведения проб	1,5 см ³
10-ти кратный концентрат буферного раствора для разбавления проб	10 см ³
20-ти кратный концентрат промывочного раствора	28 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Стоп-реагент	12 см ³
Лиюфилизированная проба с высокой концентрацией тетрациклина (150 нг/см ³), предназначенная для контаминации проб (внесения добавок)	1 шт.

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера серии в наборах реагентов производства ООО «Альгимед Техно»:

- 5-ти кратный концентрат экстракционного буферного раствора;
- концентрат буферного раствора для доведения проб;
- 10-кратный концентрат буферного раствора для разбавления проб;
- 20-кратный концентрат промывочного раствора;
- стоп-реагент;
- ТМБ-субстрат.

5 Метод измерений

Измерение массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов по настоящей методике выполняют методом, основанным на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антибиотиком группы тетрациклинов, вместе с пробой добавляют первичные антитела, специфичные к тетрациклинам. Присутствующие в пробе антибиотики группы тетрациклинов конкурируют с антибиотиком, нанесенным на стенки лунок, за связывание с внесенными антителами. После внесения вторичных антител, конъюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с первичными антителами,

связанными с антибиотиком на стенках лунки. После добавления субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность раствора при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации тетрациклина в градуировочном растворе и антибиотиков группы тетрациклинов в растворе пробы. Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

6 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

6.1 Общие требования безопасности и охраны окружающей среды

При выполнении работ в соответствии с данной методикой 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 операторов

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

7 Условия выполнения 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 % при температуре 25 °С.

Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

7.1 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 °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.

7.2 Условия 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. Если набор реагентов не планируется использовать более одного месяца, то следующие компоненты рекомендуется хранить замороженными в условиях согласно рекомендации изготовителя набора реагентов: основной стандарт тетрациклина, лиофилизированную пробу с высоким содержанием тетрациклина.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Отбор образцов и хранение

Отбор образцов для анализа проводят по ГОСТ 34668 или иному НД, утвержденному для отбора образцов в виде межгосударственного, национального стандарта или стандарта предприятия.

Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С в течение 2-х 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 изменений массовой доли воды в образце. Перед проведением подготовки проб по 8.5 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

При невозможности хранения отобранных образцов целиком хранят из представительные порции, приготовленные следующим образом. Образцы сухого молока, сухой молочной сыворотки, сухих молочных смесей для детского питания, порошка яичного тщательно перемешивают и отбирают для хранения от 80 до 100 г образца. Остальные образцы гомогенизируют, подготавливая их согласно п. 8.5 до состояния, пригодного для взятия навесок. Затем от подготовленного таким образом образца отбирают для хранения порций массой от 50 до 100 г.

Перед проведением подготовки проб замороженные порции образцов должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Размороженные порции образцов сухого молока, сухой молочной сыворотки, порошка яичного далее подвергают подготовке проб согласно п. 8.5. Размороженные порции других образцов выдерживают при температуре окружающей среды, доводя их температуру от плюс 20 °С до плюс 25 °С, после чего тщательно перемешивают их проводят подготовку проб согласно п. 8.5, начиная со стадии отбора навесок.

8.2 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой 2 раза и высушивают.

Запрещается повторное использование одноразовой лабораторной посуды.

8.3 Приготовление растворов

8.3.1 Приготовление экстракционного буферного раствора

В коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 5-ти кратного концентрата экстракционного буферного раствора, добавляют цилиндром в четыре раза больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³ 5-кратного концентрата рассчитывается на основании количества анализируемых образцов всех видов продукции, кроме меда, по формуле

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

где N_{smp} – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

V_1 – объем экстракционного буферного раствора, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 3 см³).

Экстракционный буферный раствор приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

8.3.2 Приготовление буферного раствора для разбавления проб

В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10-кратного концентрата буферного раствора для разбавления проб, добавляют мерным цилиндром в девять раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³ концентрата рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{1,8N_{smp1} + 1,6N_{smp2} + 0,8N_{smp} + V_1}{10} \quad (2)$$

где N_{smp1} – количество анализируемых образцов, за исключением сливочного масла;

N_{smp2} – количество анализируемых образцов сливочного масла;

N_{smp} – предполагаемое количество образцов, пробы которых будут подвергаться дополнительному разбавлению;

V_1 – объем буферного раствора для разбавления проб, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 1 см³).

Буферный раствор для разбавления проб приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

8.3.3 Приготовление буферного раствора для доведения проб

В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают дозатором или цилиндром аликвоту концентрата буферного раствора для доведения проб, добавляют мерным цилиндром в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.3 и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата буферного раствора для доведения рассчитывается на основании количества анализируемых образцов всех видов продукции, кроме меда, по формуле

$$V = \frac{0,6N_{smp1} + 1,6N_{smp2} + V_1}{100} \quad (3)$$

где N_{smp1} – количество анализируемых образцов, за исключением масла сливочного;

N_{smp2} – количество анализируемых образцов масла сливочного;

V_1 – объем буферного раствора для доведения проб, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 1 см³).

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

8.4 Подготовка набора реагентов

8.4.1 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 от 1 до 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.

Растворы из набора реагентов следует готовить непосредственно перед проведением ИФА. Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать остатки реагентов обратно в оригинальные флаконы.

8.4.2 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 12 + 2N_{smp} \quad (4)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с п. 8.4.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w . Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 7.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и подготовленных проб согласно схеме, предлагаемой шаблоном для обработки результатов измерений средствами Microsoft® Office Excel «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-тетрациклин», разработанного ООО «Альгимед Техно» при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик тетрациклин».

Выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно допускается только при соблюдении требований 9.2.

8.4.3 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 см³ приливают в колбу вместимостью 250 см³ 500 см³ и добавляют отмеренную мерным цилиндром вместимостью 25 см³ или 100 см³ (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 19 раз больше, чем объем концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 см³, то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 6-ти недель в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

8.4.4 Приготовление основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/см³

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

При необходимости дальнейшего использования сразу же после приготовления основной раствор тетрациклина разделяют на аликвоты объемом 0,2 см³ и хранят при температуре не выше минус 18 °С не более 4 месяца. Хранившиеся аликвоты основного раствора тетрациклина перед использованием размораживают путем выдерживания их при температуре окружающей среды в течение от 0,5 до 1 ч, после чего тщательно перемешивают на вортексе или путем многократного пипетирования (от 15 до 20 раз). Аликвоты основного раствора тетрациклина повторному замораживанию не подлежат.

8.4.5 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Градуировочные растворы тетрациклина готовят путем последовательного разбавления основного раствора тетрациклина с концентрацией 150 нг/см³, приготовленного по п. 8.4.4, следующим образом. В соответствующий флакон для хранения градуировочных растворов вносят аликвоту раствора тетрациклина и аликвоту растворителя для приготовления градуировочных растворов. Раствор тетрациклина, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот раствора и растворителя, используемые для приготовления градуировочных растворов, указаны в таблице 4. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученные градуировочные растворы тетрациклина хранению не подлежат и должны быть использованы в течение 10 часов. 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.

Таблица 4 – Схема приготовления градуировочных растворов

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

8.5 Подготовка проб

8.5.1 Подготовка проб молока (кроме сухого), сливок, десертов на молочной основе, молочной сыворотки, кисломолочных продуктов, творожных продуктов, коктейлей на молочной основе, пахты

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с разделом 8.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Образец молока объемом 50-70 см³ переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³ и тщательно перемешивают. Образцы творога, творожного продукта тщательно перетирают в ступке. При наличии в образце йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают.

Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают. Молоко и сливки предварительно обезжиривают. Для этого от подготовленного как описано выше молока или сливок отбирают с помощью пипетки или дозатора две параллельные пробы объемом по 5 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Пробирки 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 плюс 7 °С до плюс 8 °С, контролируя температуру термометром. Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности после центрифугирования.

Отбирают от подготовленного как показано выше образца (кроме молока, сливок) две параллельные навески массой 1,00 г или объемом 1 см³, взвешенные с погрешностью 0,01 г, и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Навески молока, сливок массой 1,00 г отбирают от каждой из обезжиренных как описано выше проб и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³.

В пробирки добавляют отмеренные дозатором 3 см³ экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 8.3.1, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания жира (для чего вытирают наконечник дозатора фильтровальной бумагой), и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 8.3.3, и перемешивают в течение 1 мин 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 двух часов.

8.5.2 Подготовка проб сухого молока, сухой молочной сыворотки, сухих молочных смесей для детского питания

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 8.1. Доводя температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают. Проводят восстановление проб сухого молока, сухой сыворотки, сухих молочных смесей для детского питания в соответствии с описанной ниже процедурой.

Для получения проб восстановленного сухого молока в мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают две параллельные навески образца, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г. Массы навесок в зависимости от содержания жира, составляют:

- 9,0 г для сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г для сухого молока с массовой долей жира 20 %;
- 12,5 г для сухого молока с массовой долей жира 25 %;
- 10,0 г для сухого молока с массовой долей жира, отличной от указанных выше.

Затем приливают порциями от 10 до 20 см³ дистиллированную воду, нагретую до температуры плюс 40 °С, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения сухого молока. Раствор охлаждают до

температуры от плюс 18 °С до плюс 22 °С, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Для получения проб восстановленной сухой молочной сыворотки в мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навескам приливают порциями объемом от 10 до 20 см³ дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

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

Полученные восстановленные пробы сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания подвергают процедуре обезжиривания следующим образом. От тщательно перемешанных на вортексе восстановленных проб с помощью пипетки или дозатора отбирают пробы объемом по 5 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Пробирки 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 плюс 7 °С до плюс 8 °С, контролируя температуру термометром. Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности после центрифугирования.

Восстановленные пробы молока сухого и сухой молочной сыворотки обезжириванию не подвергаются.

Дозатором отбирают по 1 см³ из каждой подготовленной, как описано выше, пробы и переносят пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 3 см³ экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 8.3.1, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надсадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания жира (для чего вытирают наконечник дозатора фильтровальной бумагой), и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 8.3.3, и перемешивают в течение 1 мин 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 двух часов.

8.5.3 Подготовка проб яиц, яичного порошка, сыра, меда, сгущенного молока, мороженого на молочной основе

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 8.1. От образцов мороженого предварительно удаляют шоколадную глазурь, вафельную оболочку и другие отделяемые немолочные компоненты.

Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Образец яиц после удаления скорлупы гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Образец меда или сгущенного молока тщательно перемешивают. 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 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см³ экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 8.3.1. Смесь в пробирках выдерживают в течение 2 мин на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин. Если после перемешивания навески проб меда или сгущенного молока растворились не полностью, пробирки с ним повторно выдерживают на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С при периодическом перемешивании вручную до полного растворения проб, но не более 5 мин.

Пробирки с пробами центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания жира² (для чего вытирают наконечник дозатора фильтровальной бумагой), и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 8.3.3, и перемешивают в течение 1 мин 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 двух часов.

8.5.4 Подготовка проб сливочного масла

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 8.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см³ экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 8.3.1. Смесь в пробирках выдерживают в течение 2 мин на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин.

Затем пробирки с пробами центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания жира

² Кроме проб меда

(для чего вытирают наконечник дозатора фильтровальной бумагой), и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 800 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 8.3.3, и перемешивают в течение 1 мин 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 двух часов.

8.5.5 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, сала, в т.ч. шпика, рыбы, рыбной продукции, креветок, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных, жира животного

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 8.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см³ экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 8.3.1. Смесь в пробирках выдерживают в течение 2 мин на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин.

Затем пробирки с пробами центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надсадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания верхнего жирового слоя, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 8.3.3, и перемешивают в течение 1 мин 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 двух часов.

8.5.6 Получение растворов проб с увеличенным фактором разбавления

Если при проведении измерений в соответствии с разделом 9 полученные значения оптической плотности подготовленных проб меньше, чем оптическая плотность градуировочного раствора с концентрацией тетрациклина 1,60 нг/см³, то в случаях, указанных в п. 10.2.2, выполняют повторные измерения растворов проб с увеличенным фактором разбавления. Для этого проводят дополнительное разбавление подготовленных по п. 8.5 растворов проб следующим образом. В стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ переносят по 100 мм³ исходных растворов проб, после чего в пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм³ раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 8.3.2, и перемешивают в течение 1 мин 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 двух часов.

9 Выполнение измерений

9.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 8.5. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с п. 8.4.

9.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно

При использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин» допускается выполнение ИФА с более, чем шестью стрипами одновременно, при соблюдении указанных ниже правил.

Для этого внесение раствора антител к тетрациклину по п. 9.3.2, конъюгата по п. 9.3.5, ТМБ-субстрата по п. 9.3.8, стоп-реагента по п. 9.3.10 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.

9.3 Процедура измерений

9.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 8.4.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 75 мм³ каждого градуировочного раствора, приготовленного согласно п. 8.4.5. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00, 0,05, 0,15, 0,40, 0,80, 1,60 нг/см³). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 75 мм³ двух параллельных проб каждого образца.

9.3.2 Добавление раствора антител

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 100 мм³ раствора антител к тетрациклину. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

9.3.3 Инкубация планшета

Помещают микротитровальный планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 55 мин.

При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение указанного выше времени в помещении при условиях, приведенных в разделе 7.1.

9.3.4 Промывка микротитровального 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. 8.4.3, 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 - от 3 до 4 объем заливаемого моющего раствора 250 мм³.

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

9.3.5 Внесение конъюгата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки микротитровального планшета добавляют по 150 мм³ конъюгата.

Аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

9.3.6 Инкубация планшета

Сразу же после добавления конъюгата микротитровальный планшет помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 25 мин.

При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение указанного выше времени в защищенном от света месте при условиях, приведенных в разделе 7.1.

9.3.7 Промывка планшета

Промывают планшет в соответствии с п. 9.3.4.

9.3.8 Добавление ТМВ-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 медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

НЕ ДОПУСКАЕТСЯ выливать обратно в оригинальный флакон остатки субстрата во избежание его контаминации.

9.3.9 Инкубация планшета

Планшет помещают 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 7.1.

9.3.10 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в лунки планшета добавляют по 100 мм³ стоп-реагента, отмеренных дозатором, и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

9.3.11 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.

10 Обработка результатов измерения

10.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов

Обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса программы, выполняют с помощью Microsoft® Office Excel с применением шаблона «Шаблон для робсчета результатов ИФА антибиотик-тетрациклин) – далее «шаблон».

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

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (5)$$

где B – оптическая плотность раствора тетрациклина;

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

C – массовая концентрация тетрациклина в растворе, нг/см³.

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

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

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x - a}{b}\right), \quad (6)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблице 5.

Таблица 5 – Значения факторов разбавления для подготовленных проб при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-тетрациклин»

Наименование пробы	Фактор разбавления
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), молоко сухое, сливки, десерты на молочной основе, сгущенное молоко, мороженое на молочной основе, коктейли на молочной основе (в т.ч. йогуртные), пахта, сливки, восстановленная сухая молочная смесь для детского питания, сыр, кисломолочные продукты (ряженка, айран, простокваша, варенец, ацидофилин с наполнителями и без, творог, йогурт, кефир, сметана), творожные продукты (в том числе творожные сырки, зерненный творог, творожная масса, творожная паста и подобные продукты с наполнителями и без), молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка, яйца, яичный порошок, сыр, сгущенное молоко, мороженое на молочной основе, мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки, яйца, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, переработанная и непереработанная пищевая рыбная продукция животного происхождения, в т.ч. для детского питания (кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, рыбные консервы и пресервы, икра, варено-мороженая пищевая рыбная продукция), субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, яичный порошок, мед	10
Масло сливочное	20

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

10.2.1 Применение дополнительного разбавления проб

Если хотя бы один из результатов измерений оптической плотности параллельных проб, для которых не проводилось дополнительное разбавление по п. 8.5.6, меньше оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией тетрациклина $1,60 \text{ нг/см}^3$, то производят действия в соответствии с п. 8.5.6, после чего повторяют измерения согласно разделу 9. Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в таких пробах рассчитывается по формуле (6) с использованием следующих факторов разбавления:

- $F=100$ для проб сливочного масла;
- $F=50$ для других проб согласно области применения.

Если хоть один из результатов измерений оптической плотности параллельных проб, для которых проводилось дополнительное разбавление по п.8.5.6, меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией тетрациклина $1,60 \text{ нг/см}^3$, то проводят обработку этих результатов согласно 10.2.2.

10.2.2 Обработка результатов измерений параллельных проб

Рассчитывают среднее арифметическое $\bar{X}$ результатов двух измерений параллельных проб по формуле (7) без проведения контроля повторяемости. Если полученное значение $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 3, то окончательный результат измерений не рассчитывают, а проводят одностороннюю оценку массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значений верхней границы диапазона измерений согласно п.11.2. Если полученное значение $\bar{X}$ оказывается не больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 3, то проводят расчет окончательного результата измерений по п. 10.3.

10.3 Расчет окончательного результата измерений

Рассчитывают среднее арифметическое $\bar{X}$, мкг/кг, результатов двух измерений параллельных проб по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (7)$$

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

Если рассчитанное значение $\bar{X}$ оказывается меньше, чем значение предела измерений, указанного в разделе 3 как нижняя граница диапазона измерений, то вместо окончательного результата измерения выдают одностороннюю оценку массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения предела измерений согласно п. 11.2.

В противном случае за окончательный результат измерений принимают полученное значение $\bar{X}$ при выполнении условия повторяемости по п. 12.2. Окончательный результат измерений округляют до трех значащих цифр.

11 Форма представления результатов измерений

11.1 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 10;

$U(X)$ – 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 2.

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

11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов

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

$$\text{Менее } X_{LQ}, \quad (10)$$

где X_{LQ} – значение предела измерений, равное нижней границе диапазона измерений согласно разделу 3, мкг/кг.

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

$$\text{Более } X_{HL}, \quad (11)$$

где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 3, мкг/кг.

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 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 выполнения измерений.

12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725–6 (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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (12)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (7).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X} \quad (13)$$

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

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

При невыполнении условия (12) проводят повторные измерения согласно разделу 9.

12.3 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 СТБ ИСО 5725–6 (ГОСТ Р ИСО 5725–6) следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\bar{X}_1, \bar{X}_2$ согласно разделу 9, варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости по п. 12.2. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\bar{X}_1, \bar{X}_2$

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

при их соответствии условию (16)

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

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

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

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

12.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

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

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 9 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 12.2.

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

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

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

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_R \quad (18)$$

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

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

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

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

k – коэффициент, равный 1,2;

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

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

Таблица 6 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, кисломолочная продукция (ряженка, айран, простокваша, творог, кефир, ацидофилин с наполнителями и без), творожные продукты 9в том числе творожные сырки, зерненный творог, творожная масса, творожная паста и подобные продукты с наполнителями и без)	14	16	14
Десерты на молочной основе, коктейли на молочной основе (в т.ч. йогуртные), пахта, кисломолочная продукцию (йогурт, варенец, сметана), молоко сухое, молочная сыворотка, сухая молочная	22	17	17

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
сыворотка, сухая молочная смесь для детского питания, сыр, сгущенное молоко, мороженое на молочной основе, яйца, яичный порошок, мед	22	17	17
Мясо, готовые к потреблению мясные продукты, сало в т.ч. шпик, жиры животные, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, икра	18	16	15
Переработанная и непереработанная пищевая рыбная продукция животного происхождения, в т.ч. для детского питания (рыба, кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция), креветки, масло сливочное	27	19	18

12.5 Контроль правильности

12.5.1 Образцы для контроля правильности

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

При использовании добавок ОК представляют собой навеску пробы образца, не содержащего антибиотиков группы тетрациклинов, в которую внесена добавка раствора тетрациклина. Используемые при этом образцы до внесения добавки должны быть предварительно гомогенизированы до однородного состояния и сохранять однородность состава и консистенции в течение всего предполагаемого срока хранения.

Оценка массово доли антибиотиков группы тетрациклинов в подготовленных таким образом образцах без добавки должна быть не более значения, соответствующего градуировочному раствору с концентрацией

0,05 нг/см³. Требуемые значения оценок массовой доли в образцах рассчитывают по формуле (7) на основании полученных согласно разделу 9 результатов измерений двух параллельных проб каждого такого образца без проведения контроля повторяемости по п.12.2 и интерпретации результатов по п.10.3. Допускается получение вышеуказанных значений оценок в образцах без добавки с помощью другой аттестованной (стандартизованной) методики, имеющей соответствующий предел измерений (обнаружения). В качестве образцов, в которые вносятся добавки, могут быть также использованы контрольные (референсные) образцы, свойства которых, в том числе приписанное изготовителем значение массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов, соответствуют указанным выше условиям.

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

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

где C_{ST} – массовая концентрация раствора тетрациклина, нг/см³;

V_{ST} – объем раствора тетрациклина, см³;

m – масса навески пробы, г.

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

Приписанное значение массовой доли тетрациклина в пробе с добавкой должно находиться в пределах от 35 % до 100 % верхней границы диапазона измерений.

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

12.5.2 Проведение контрольной процедуры

При проведении контрольной процедуры получают два результата измерений параллельных проб ОК в соответствии с требованиями раздела 9.

За результат контрольного измерения $\overline{X}_K$, мкг/кг принимают результат измерения массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, рассчитанный по формуле (14) при выполнении условия повторяемости по п. 12.2.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X}_K - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot X_{am}, \quad (21)$$

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

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

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

12.6 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 [5] и СТБ ИСО 5725–6, раздел 6.

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости в соответствии с разделом 3.

Примечание – При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы данные измерений, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики может быть заявлено только в том случае, если показатель повторяемости, рассчитанный по накопленным лабораторией данным, статистически не превышает установленных методикой значений.

Для построения и ведения R-карт в качестве образцов для контроля (ОК) могут использоваться рабочие образцы.

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора тетрациклина, приготовленного из тетрациклина гидрохлорида в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Предварительно установленная массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в данных пробах без добавки должна соответствовать требованиям к образцам без добавки согласно п. 12.5.1. Рекомендуются вносить добавку тетрациклина в образцы для контроля на уровне значений массовой доли в рабочих пробах.

12.6.1 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

$$CL = d_2 \cdot \sigma = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (22)$$

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

d_2 – коэффициент, равный 1,128;

- предупреждающие границы

$$UCL_1 = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r \quad (23)$$

- границы регулирования

$$UCL_2 = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r \quad (24)$$

где D_2^1 , 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 измерений ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой,

расчет фактических относительных значений размаха W по формуле (25), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 - X_2}, \quad (25)$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5]/

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формуле

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N W_i / N}{d_2}, \quad (26)$$

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

d_2 – коэффициент, $d_2 = 1,128$.

12.6.2 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

$$\overline{\text{Rec}} = \frac{\sum_{i=1}^N \text{Rec}_i}{N}, \quad (27)$$

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

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

$$\text{Rec}_i = \frac{X_i}{X_{\text{exp}}} \cdot 100, \quad (28)$$

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

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

– предупреждающие границы

$$UCL_1 = \overline{\text{Rec}} + 2 \cdot S_{\text{REC}} \quad LCL_1 = \overline{\text{Rec}} - 2 \cdot S_{\text{REC}} \quad (29)$$

– границы регулирования

$$UCL_2 = \overline{\text{Rec}} + 3 \cdot S_{\text{REC}} \quad LCL_2 = \overline{\text{Rec}} - 3 \cdot S_{\text{REC}} \quad (30)$$

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

$$S_{\text{REC}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{\text{Rec}} - \text{Rec}_i)^2}{N-1}} \quad (31)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений X_i при выполнении испытаний ОК в соответствии с методикой измерений, расчета фактических значений коэффициента извлечения Rec , по формуле (28), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5].

Библиография

[1]	VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, V.J. Barwick and S.L.R. Ellison, LGC/VAM/1998/088
[2]	ТУ ВУ 100231303.011 – 2002 Секундомер электронный «Интеграл С-01»
[3]	ТУ 2642-054-23050963-2008 Бумага индикаторная. Технические условия
[4]	ТУ ВУ191218537.007-2015 Набор реагентов для определения содержания антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа «ИФА антибиотик - тетрациклин»
[5]	ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты Часть 2. Контрольные карты Шухарта