

УТВЕРЖДАЮ

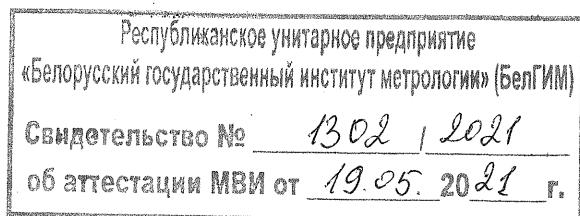
Директор ООО «Альгимед Техно»

В.В. Лютынский

«13» апреля 2021

Извещение об изменении № 1
МВИ.МН 3830-2015

**Методика выполнения измерений содержания антибиотиков
группы тетрациклинов в продукции животного происхождения
методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® и
ИФА антибиотик - тетрациклин**



РАЗРАБОТЧИК:

Начальник отдела разработок
новой продукции
ООО «Альгимед Техно»

Арсланова С.С. Арсланова
«13» апреля 2021

МИНСК, 2021

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по науке БелГИМ


Н.В. Баковец

“ 19 ”

2021



ЭКСПЕРТНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам метрологической экспертизы
извещения об изменении методики (метода) измерений

Обозначение и наименование МВИ.МН 3830-2015 «Методика выполнения измерения содержания антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® и ИФА антибиотик-тетрациклин»

Разработчик: ООО «Альгимед Техно»

На метрологическую экспертизу представлены следующие документы:

- 1 Извещение об изменении № 1 МВИ.МН 3830-2015.
- 2 Отчет.

По результатам метрологической экспертизы установлено:

1 Извещением об изменении № 1 наименование методики изменено на «Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения. Методика измерений методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» и набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин».

2 Представленный документ с изменением № 1 устанавливает методику измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» или набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин» и обладает следующими метрологическими характеристиками:

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 , %, $k=2$, $P=95\%$
Метрологические характеристики при использовании набора реагентов MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)					
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	от 0,60 до 12,80 включ.	4,3	5,3	6	12
Молоко сухое	от 6,00 до 128,00 включ.	4,5	6,4	7	14
Молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка	от 0,60 до 12,80 включ.	2,1	5,2	7	14
Масло сливочное, сыр, яйца	от 3,00 до 32,00 включ.	3,2	5,6	7	14
Творог	от 3,00 до 32,00 включ.	4,0	5,4	6	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	от 1,50 до 16,00 включ.	5,2	8,3	9	18
Мед	от 3,00 до 32,00 включ.	3,3	5,3	6	12
Йогурт, кефир, сметана	от 0,60 до 12,80 включ.	5,7	7,4	8	16

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(ТО)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k = 2$, $P = 95$ %
Метрологические характеристики при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»					
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, кисломолочная продукция (ряженка, айран, простокваша, творог, кефир, ацидофилин с наполнителями и без), творожные продукты (в т.ч. 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	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, мороженное на молочной основе, яйца, яичный порошок		7,7	8,2	9	18
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, сало в т.ч. шпик, жиры животные, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, икра		6,5	7,4	8	16
Переработанная и перепереработанная пищевая рыбная продукция животного происхождения, в т.ч. для детского питания (рыба, кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, варено-мороженная пищевая рыбная продукция), креветки		9,5	9,5	10	20
Мед	от 3,00 до 80,00 включ.	7,7	8,2	9	18
Масло сливочное	от 3,00 до 160,00 включ.	9,5	9,5	10	20

2 Методика соответствует требованиям ГОСТ 8.010-2013 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения».

3 Методика может быть использована для измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» или набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин».

Начальник отдел испытаний пищевой
и сельскохозяйственной продукции



Н.В. Воцула



ДЗЯРЖАЎНЫ КАМІТЭТ ПА СТАНДАРТЫЗАЦЫІ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства
«БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАЎНЫ
ІНСТЫТУТ МЕТРАЛОГІІ»
(БелДІМ)

Старавіленскі тракт, 93, 220053, г. Мінск
тэл. + 375 17 374 55 01, факс + 375 17 244 99 38
эл. пошта: info@belgim.by, вэб-сайт: www.belgim.by
УНП 100055197, АКПА 02568454
IBAN BY11 BPSB 3012 1027 7601 4933 0000
у ААТ «БПС-Сбербанк», БИК BPSBBY2X

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Республиканское унитарное предприятие
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ИНСТИТУТ МЕТРОЛОГИИ»
(БелГИМ)

Старовиленский тракт, 93, 220053, г. Минск
тел. + 375 17 374 55 01, факс + 375 17 244 99 38
эл. почта: info@belgim.by, веб-сайт: www.belgim.by
УНП 100055197, ОКПО 02568454
IBAN BY11 BPSB 3012 1027 7601 4933 0000
в ОАО «БПС-Сбербанк», БИК BPSBBY2X

На № 19.05.2021 № 40.2-08/17776 ад _____
СВИДЕТЕЛЬСТВО № 1302/2021
об аттестации методики (метода) измерений

Вх. № 24-01/05
«24» 05 2021 г.

Методика измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» или набора реагентов «ИФА антибиотик-тетрациклин», разработанная ООО «Альгимед Техно», и регламентированная в **МВИ.МН 3830-2015 «Методика выполнения измерений содержания антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием наборов реагентов MaxSignal® и ИФА антибиотик-тетрациклин» с изменением № 1** аттестована в соответствии с ГОСТ 8.010-2013.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по разработке и экспериментальному исследованию методики измерений с изменением № 1.

В результате аттестации установлено, что методика измерений с изменением № 1 соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками при принятой доверительной вероятности $P=0,95$:

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 , %, $k=2$, $P=95\%$
Метрологические характеристики при использовании набора реагентов MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)					
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	от 0,60 до 12,80 включ.	4,3	5,3	6	12
Молоко сухое	от 6,00 до 128,00 включ.	4,5	6,4	7	14
Молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка	от 0,60 до 12,80 включ.	2,1	5,2	7	14
Масло сливочное, сыр, яйца	от 3,00 до 32,00 включ.	3,2	5,6	7	14
Творог	от 3,00 до 32,00 включ.	4,0	5,4	6	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	от 1,50 до 16,00 включ.	5,2	8,3	9	18
Мед	от 3,00 до 32,00 включ.	3,3	5,3	6	12
Йогурт, кефир, сметана	от 0,60 до 12,80 включ.	5,7	7,4	8	16

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторности σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(ТО)}$, %	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k = 2$, $P = 95\%$
Метрологические характеристики при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»					
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, кисломолочная продукция (ряженка, айран, простокваша, творог, кефир, ацидофилин с наполнителями и без), творожные продукты (в т.ч. 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	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, мороженное на молочной основе, яйца, яичный порошок		7,7	8,2	9	18
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, сало в т.ч. шпик, жиры животные, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, икра		6,5	7,4	8	16
Переработанная и непереработанная пищевая рыбная продукция животного происхождения, в т.ч. для детского питания (рыба, кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, варено-мороженная пищевая рыбная продукция), креветки		9,5	9,5	10	20
Мед	от 3,00 до 80,00 включ.	7,7	8,2	9	18
Масло сливочное	от 3,00 до 160,00 включ.	9,5	9,5	10	20

Заместитель директора по науке

Н.В. Баковец

000896



ООО «Альгимед Техно»		ИЗВЕЩЕНИЕ № 1		ОБОЗНАЧЕНИЕ ДОКУМЕНТА МВИ.МН 3830-2015		
Дата выпуска		Срок изменения			Лист 2	Листов 2
ПРИЧИНА		Изменение эксплуатационных документов на тест-систему			Код -	
УКАЗАНИЕ 0 ЗАДЕЛЕ						
УКАЗАНИЕ 0 ВНЕДРЕНИИ						
ПРИМЕНЯЕМОСТЬ						
РАЗОСЛАТЬ		Всем абонентам				
ПРИЛОЖЕНИЕ		На 42 листах				
ИЗМ.		СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ				
1						

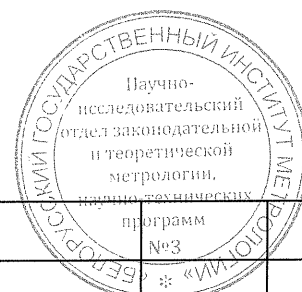
Титульный лист

Наименование методики изложить в новой редакции:

«СИСТЕМА ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗМЕРЕНИЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в продукции животного происхождения. Методика измерений методом ИФА с использованием наборов реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» и «ИФА антибиотик – тетрациклин»»

Листы 2-36 заменить.

Выпущены листы 37-42.



Составил					
Проверил				Н.контр.	
Изменение внес					

СОДЕРЖАНИЕ

Вводная часть.....	3
1 Нормативные ссылки.....	4
2 Показатели точности измерений.....	5
3 Требования к средствам измерений, испытательному оборудованию, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам, посуде.....	9
3.1 Средства измерений, испытательное оборудование и вспомогательные устройства.....	9
3.2 Материалы, реактивы, посуда.....	10
4 Метод измерений.....	12
5 Требования безопасности, охраны окружающей среды и к квалификации операторов.....	13
5.1 Требования безопасности и охраны окружающей среды.....	13
5.2 Требования к квалификации операторов.....	13
6 Требования к условиям измерений.....	13
7 Требования к условиям инкубации микротитровальных планшетов в помещении.....	13
8 Требования к условиям хранения набора реагентов.....	14
9 Подготовка к выполнению измерений.....	14
9.1 Подготовка лабораторной посуды.....	14
9.2 Приготовление растворов.....	14
9.3 Подготовка набора реагентов.....	17
9.4 Требования к отбору образцов.....	20
9.5 Хранение образцов.....	20
9.6 Подготовка проб.....	21
10 Порядок выполнения измерений.....	28
10.1 Общие требования.....	28
10.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно.....	28
10.3 Процедура измерений.....	28
11 Обработка результатов измерений.....	30
11.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в пробах.....	30
11.2 Действия при получении результата измерений оптической плотности проб меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с максимальной массовой концентрацией.....	32
11.3 Расчет окончательного результата измерений.....	33
12 Форма представления результатов измерений.....	33
12.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности.....	33
12.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли.....	33
13 Контроль точности результатов измерений.....	34
13.1 Периодичность проведения контроля точности.....	34
13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	34
13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности.....	35
13.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.....	35
13.5 Контроль правильности.....	37
13.6 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК).....	39
Библиография.....	42



Вводная часть

Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее – методика) массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов* в указанной ниже продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» или набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин», далее – набор реагентов.

Область применения методики включает в себя следующие виды продукции:

- при использовании обоих вышеуказанных наборов реагентов – молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, масло сливочное, сыр, кисломолочная продукция (творог, йогурт, кефир, сметана), молочную сыворотку, сухую молочную сыворотку, мясо, готовые к употреблению мясная продукция, рыбу, креветки, яйца, мед;
- при использовании только набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» – молоко ультрапастеризованное, десерты на молочной основе, сгущенное молоко, мороженое на молочной основе, коктейли 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 ее изготовителя;
- в яичном порошке – к продукции, восстановленной согласно ГОСТ 30364.0.

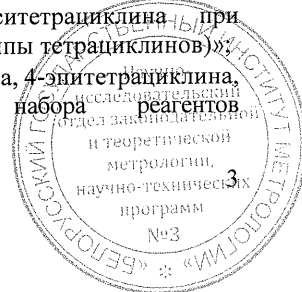
Диапазон измерений методики, а также предел измерений, определяемый как нижняя граница диапазона измерений, приведены в разделе 2, таблицы 1, 2.

Настоящая методика может применяться в сфере законодательной метрологии, а также вне неё, 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;

* 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 соответствующего набора реагентов:

- тетрациклина, хлортетрациклина, ролитетрациклина, демеклоциклина, окситетрациклина при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;
- тетрациклина, хлортетрациклина, доксициклина, демеклоциклина, окситетрациклина, 4-эпитетрациклина, 4-эпиохлортетрациклина, 4-эпиокситетрациклина при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин».

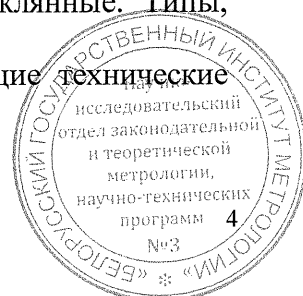


- проведение лабораторно-диагностических исследований.
Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

1 Нормативные ссылки

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

СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности
СТБ ИСО 5725-2-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике
СТБ ISO 21748-2019	Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерений
ГОСТ 8.010–2013	Государственная система обеспечения единства измерений. Методики 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 245-76	Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 3118–77	Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
ГОСТ 4233-77	Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4234-77	Реактивы. Калий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4328-77	Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ 4198-75	Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 9147-80	Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
ГОСТ 10652-73	Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). 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
ГОСТ 34100.3-2017	Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по
ISO/IEC Guide 98-3:2008	выражению неопределенности измерения

Примечание – При пользовании настоящей методикой целесообразно проверить действие ТНПА по каталогу, по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться замененными (измененными) ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части не затрагивающей эту ссылку.

2 Показатели точности измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в диапазоне и с показателями точности, указанными в таблицах 1, 2.

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 таблицах 3, 4.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Виды продукции	Определяемые вещества	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение	
			повторяемости σ_r , %	промежуточной прецизионности $\sigma_{I(70)}$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	Антибиотики группы тетрациклинов	от 0,60 до 12,8 включ.	4,3	5,3
Молоко сухое		от 6,00 до 128 включ.	4,5	6,4
Молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка		от 0,60 до 12,8 включ.	2,1	5,2
Масло сливочное, сыр, яйца		от 3,00 до 32,0 включ.	3,2	5,6
Творог		от 3,00 до 32,0 включ.	4,0	5,4
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки		от 1,50 до 16,0 включ.	5,2	8,3
Мед		от 3,00 до 32,0 включ.	3,3	5,3
Йогурт, кефир, сметана		от 0,60 до 12,8 включ.	5,7	7,4

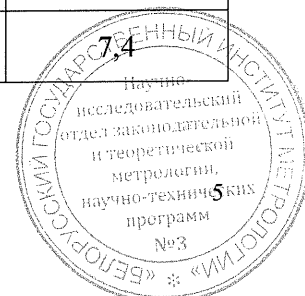


Таблица 2 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

Виды продукции	Определяемые вещества	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение	
			повторяемости σ_r , %	промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
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)	Антибиотики группы тетрациклинов	от 1,00 до 80,0 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, полуфабрикаты 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 (рыба, кулинарные изделия и полуфабрикаты из рыбы, варено-мороженая пищевая рыбная продукция), креветки			9,5	9,5
Мед		от 3,00 до 80,0 включ.	7,7	8,2
Масло сливочное		от 3,00 до 160 включ.	9,5	9,5

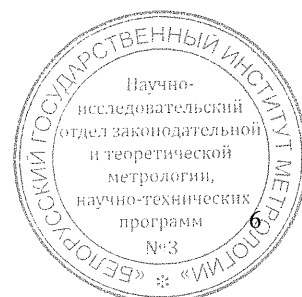
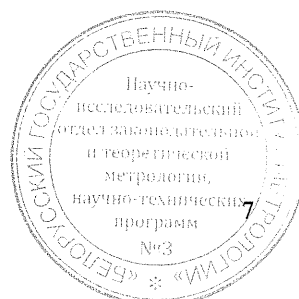


Таблица 3 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с методикой при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Виды продукции	Определяемые вещества	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k = 2, P = 95 \%$
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	Антибиотики группы тетрациклинов	от 0,6 до 12,8 включ.	6	12
Молоко сухое		от 6,00 до 128 включ.	7	14
Молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка		от 0,60 до 12,8 включ.	7	14
Масло сливочное, сыр, яйца		от 3,00 до 32,0 включ.	7	14
Творог		от 3,00 до 32,0 включ.	6	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки		от 1,50 до 16,0 включ.	9	18
Мед		от 3,00 до 32,0 включ.	6	12
Йогурт, кефир, сметана		от 0,60 до 12,8 включ.	8	16

Таблица 4 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с методикой при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

Виды продукции	Определяемые вещества	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)	Антибиотики группы тетрациклинов	от 1,00 до 80,0 включ.	8	16



Продолжение таблицы 4

Виды продукции	Определяемые вещества	Диапазон измерений массовой доли, мкг/кг	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $k = 2, P = 95$ %
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	Антибиотики группы тетрациклинов	от 1,00 до 80,0 включ.	9	18
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, сало в т.ч. шпик, жиры животные, субпродукты, консервы мясные и мясорастительные, полуфабрикаты мясные и мясорастительные, рыбные консервы и пресервы, икра			8	16
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			10	20
Мед		от 3,00 до 80,0 включ.	9	18
Масло сливочное		от 3,00 до 160 включ.	10	20

Эксперименты по оцениванию метрологических характеристик методики были проведены в 2011, 2013, 2014, 2015, 2020 гг в лаборатории химии пищевых продуктов, лаборатории микробиологии ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены», лаборатории санитарно-химических и токсикологических методов исследований ГУ «РЦГЭиОЗ», г. Минск. Указанные в таблицах 1 – 4 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента, проведенного в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2;
- показатели правильности – [1];
- оценки неопределенности – ГОСТ 34100.3, СТБ ISO 21748, [1].



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

3.1 Средства измерений, испытательное оборудование и вспомогательные устройства

Весы электронные лабораторные 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 измерения оптической плотности не более $\pm 5\%$), например EMax Plus, производства Molecular Devices LLC, США.

Программное обеспечение «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанное BIOO Scientific a Perkin Elmer company (США), при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

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 I 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 2 °С до 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 BioSan Ltd, Латвия.

Лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость не менее 300 об/мин, например, термошейкер PST-60HL, производства BioSan Ltd, Латвия.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий скорость вращения не менее 60 об/мин.

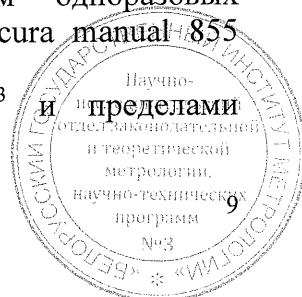
Гомогенизатор лабораторный типа ULTRA-TURRAX производства IKA® Werke GmbH & Co. KG (Германия), например Ultra Turrax DI 25 Digital или бытовой блендер.

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

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от 70 °С до 75 °С, (75 $\pm$ 1) °С.

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 пределами относительной погрешности дозирования $\pm 2,5\%$;



- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и пределами относительной погрешности дозирования $\pm 1,5 \%$;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см³ и пределами относительной погрешности дозирования $\pm 2,0 \%$;
- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм³ и пределами относительной погрешности дозирования $\pm 1,5 \%$.

Средства измерений для контроля условий окружающей среды:

- температуры воздуха с диапазоном измерений, включающем диапазон от 15 °С до 25 °С, и пределами погрешности измерений не более $\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$;
- влажности воздуха с диапазоном измерений, включающем диапазон от 15 % до 80 %, и пределами относительной погрешности измерений не более $\pm 3 \%$.

Средства измерения для контроля температуры образцов с диапазоном измерений, включающем диапазон от 18 °С до 25 °С и пределами погрешности измерений не более $\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

- Инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 25 °С с точностью $\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 мм³ 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, допущенные к применению и прошедшие метрологический контроль согласно порядку, установленному законодательством Республики Беларусь.

3.2 Материалы, реактивы, посуда

Пленка «парафильм».

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

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

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Шпатели пластиковые.

Штатив для пробирок.

Пипетки Пастера.

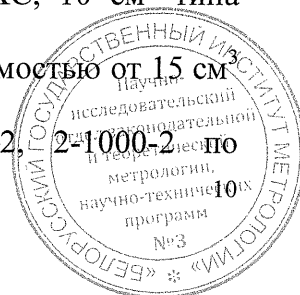
Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 см³.

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

Пробирки стеклянные вместимостью 5 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 см³ до 50 см³.

Колбы мерные вместимостью 100; 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 29227.

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.

V-образные одноразовые ванночки для реагентов (для многоканальных дозаторов) вместимостью от 50 до 60 см³.

Натрия фосфат двуосновной (Na₂HP0₄), каталожный номер Sigma-Aldrich S7907 или натрий фосфорнокислый двузамещенный 2-водный (Na₂HP0₄·2H₂O) ч.д.а по ГОСТ 245.

Натрий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4233.

Калий хлористый ч.д.а. по ГОСТ 4234.

Натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328.

Кислота соляная ч.д.а. по ГОСТ 3118.

Калий фосфорнокислый однозамещенный х.ч. (ч.д.а.) по ГОСТ 4198.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

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

Набор реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)», каталожный номер 1016-04C («MaxSignal® Tetracycline (TET Group) ELISA Test Kit», Reference # 1016-04C), производства BIOO Scientific a Perkin Elmer company (США), или 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 (таблицы 5, 6).

Таблица 5 – Состав набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых тетрациклином)	1 шт.
Основной стандарт тетрациклина массой 225 нг (порошок) для приготовления градуировочных растворов	3 шт.
Флаконы для приготовления градуировочных растворов тетрациклина с массовой концентрацией 0; 0,05; 0,15; 0,40; 0,80; 1,60 нг/см ³	6 шт.
Раствор антител к тетрациклину № 1	12 см ³
Конъюгат антител с пероксидазой № 2 (100× концентрат)	0,3 см ³
Растворитель для антител № 2	20 см ³
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 см ³
Стоп-реагент	14 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Экстракционный ОХТЕТ-буфер (5× концентрат)	2×25 см ³
Растворитель для приготовления градуировочных растворов	28 см ³
ТЕТ-реагент для очистки проб молока	10 см ³
ТЕТ-буфер для доведения проб молока	25 см ³
ТЕТ-буфер для доведения проб мяса	25 см ³



Таблица 6 – Состав набора 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 тетрациклина с массовой концентрацией 0; 0,05; 0,15; 0,40; 0,80; 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
Лиофилизированная 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 в наборах реагентов производства BIOO Scientific a Perkin Elmer company:

- растворитель для антител № 2;
- промывочный раствор;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

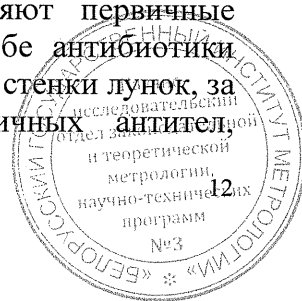
Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера серии в наборах реагентов производства ООО «Альгимед Техно»:

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

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

4 Метод измерений

Измерения массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов по настоящей методике выполняют методом, основанным на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антибиотиком группы тетрациклинов, вместе с пробой добавляют первичные антитела, специфичные к тетрациклинам. Присутствующие в пробе антибиотики группы тетрациклинов 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 массовой концентрации тетрациклина в градуировочном растворе и антибиотиков группы тетрациклинов в растворе пробы. Массовая доля антибиотиков группы тетрациклинов в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием шести градуировочных растворов.

5 Требования безопасности, охраны окружающей среды и к квалификации операторов

5.1 Требования безопасности и охраны окружающей среды

При выполнении работ по данной 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.

5.2 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 на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа.

6 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений согласно методике в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

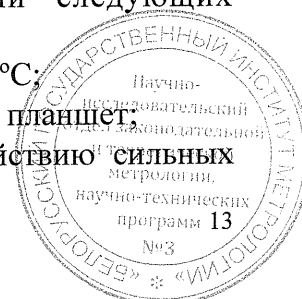
- температура окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 %.

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

7 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 20 °С до 25 °С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- микротитровальный 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, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например, в ящик стола.

8 Требования к условиям хранения набора реагентов

Набор реагентов хранят согласно рекомендации изготовителя в оригинальных флаконах и упаковке. Микротитровальные планшеты должны храниться в плотно закрытой упаковке. Если наборы реагентов не планируется использовать более 1 мес, то следующие компоненты хранят замороженными в условиях согласно рекомендации изготовителя набора реагентов:

- основной стандарт тетрациклина, раствор антител к тетрациклину № 1, конъюгат антител с пероксидазой № 2 (набор реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»);
- основной стандарт тетрациклина, лиофилизированную пробу с высоким содержанием тетрациклина (набор реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»).

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 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.

9.2 Приготовление растворов

9.2.1 Приготовление растворов, используемых при работе с набором реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

9.2.1.1 Приготовление раствора гидроокиси натрия массовой долей 30 %

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

9.2.1.2 Приготовление 10 мМ фосфатно-солевого буфера

Навески калия фосфорнокислого однозамещенного массой 0,240 г, калия хлористого массой 0,200 г, взвешенные с погрешностью не более 0,001 г, а также



натрия фосфата двуосновного массой 1,44 г (или натрия фосфорнокислого двузамещенного 2-водного массой 1,87 г), натрия хлористого массой 8,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы колба заполнилась до половины своей вместимости, перемешивают до полного растворения, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. После приготовления раствора его pH доводят до 7,4, добавляя по каплям раствор гидроокиси натрия массовой долей 30 %, приготовленный по п. 9.2.1.1. Раствор хранят при температуре от 20 °С до 25 °С не более 1 мес.

9.2.1.3 Приготовление экстракционного ОХТЕТ-буфера

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

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата экстракционного ОХТЕТ-буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок, масла, сыра, творога, яиц по формуле

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

где $N_{\text{смп}}$ – количество вышеперечисленных анализируемых образцов;

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

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

9.2.1.4 Приготовление раствора NaOH молярной концентрацией 1 моль/дм³

Навеску гидроокиси натрия массой 4,00 г, взвешенную с погрешностью 0,01 г, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют дистиллированную воду в таком количестве, чтобы колба заполнилась до половины своей вместимости. После растворения гидроокиси натрия, раствор доводят до метки дистиллированной водой, и перемешивают. Раствор хранят при температуре от 20 °С до 25 °С в плотно закрытой полиэтиленовой или фторопластовой посуде не более 1 мес.

9.2.1.5 Приготовление раствора HCl молярной концентрацией 1 моль/дм³

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



9.2.2 Приготовление растворов, используемых при работе с набором реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

9.2.2.1 Приготовление экстракционного буферного раствора

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

Объем используемой аликвоты V , см³, 5-ти кратного концентрата экстракционного буферного раствора рассчитывается на основании количества анализируемых образцов всех видов продукции по формуле

$$V = \frac{6N_{smp} + V_1}{5}, \quad (2)$$

где N_{smp} – количество 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.

9.2.2.2 Приготовление буферного раствора для разбавления проб

В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают дозатором или мерным 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 буферного раствора для разбавления рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{0,6N_{smp1} + 1,6N_{smp2} + 0,8N_{smp} + V_1}{10}, \quad (3)$$

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

N_{smp2} – количество анализируемых образцов масла сливочного;

N_{smp} – предполагаемое количество образцов, пробы которых будут подвергаться дополнительному разбавлению по п. 9.6.3.6;

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

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

9.2.2.3 Приготовление буферного раствора для доведения проб

В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают дозатором 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. 9.2.2.2



перемешивают раствор.

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

$$V = \frac{0,6N_{smp1} + 1,6N_{smp2} + V_1}{100}, \quad (4)$$

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.

9.3 Подготовка набора реагентов

9.3.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С от 1 до 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от 20 °С до 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.

9.3.2 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 12 + 2N_{SMP}, \quad (5)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с п. 9.3.1, 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 8.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и подготовленных проб согласно схеме, предлагаемой программным обеспечением:

- «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанное BIOO Scientific a Perkin Elmer company (США), при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;
- Шаблон для обработки результатов измерений средствами Microsoft® Office



Excel «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-тетрациклин», разработанный ООО «Альгимед Техно» при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин».

При использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» не следует одновременно использовать более шести стрипов. Если необходимо провести измерение более 18 образцов, ИФА выполняется несколько раз.

При использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» допускается выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно при выполнении требований п. 10.2.

9.3.3 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 см³ приливают в коническую колбу вместимостью 250 см³ или 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 2 °С до 8 °С не более 6 нед в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.3.4 Приготовление растворов при работе с набором реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

9.3.4.1 Приготовление основного раствора тетрациклина с массовой 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 должен быть использован не позднее чем через 10 ч после приготовления.

9.3.4.2 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Градуировочные растворы тетрациклина готовят путем последовательного разбавления основного раствора тетрациклина с массовой концентрацией 150 нг/см³, приготовленного по п. 9.3.4.1, 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 7. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученные градуировочные растворы тетрациклина должны быть использованы не позднее чем через 10 ч после приготовления. После использования остатки градуировочных растворов должны быть удалены из флаконов, подлежащих хранению. Пустые флаконы используются при последующем приготовлении градуировочных растворов и должны храниться в составе набора реагентов.



холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С.

Таблица 7 – Схема приготовления градуировочных растворов

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

9.3.4.3 Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2

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

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

$$V = \frac{150N_w + V_1}{100}, \quad (6)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых при проведении измерений, рассчитывается по п. 9.3.2;

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

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

9.3.5 Приготовление растворов, используемых при работе с набором реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

9.3.5.1 Приготовление основного раствора тетрациклина с массовой 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 должен быть использован в течение 10 ч.

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 мес. 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.

9.3.5.2 Приготовление градуировочных растворов тетрациклина

Градуировочные растворы тетрациклина готовят путем последовательного разбавления основного раствора тетрациклина с массовой концентрацией 150 нг/см^3 , приготовленного по п. 9.3.5.1, 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 8. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Полученные градуировочные растворы тетрациклина хранению не подлежат и должны быть использованы в течение 10 ч. После использования остатки градуировочных растворов должны быть удалены из флаконов, подлежащих хранению. Пустые флаконы используются при последующем приготовлении градуировочных растворов и должны храниться в составе набора реагентов в холодильнике при температуре от 2°C до 8°C .

Таблица 8 – Схема приготовления градуировочных растворов

Номер град. раствора	Массовая концентрация градуировочного раствора, нг/см^3	Источник аликвоты раствора тетрациклина для приготовления градуировочного раствора	Объем аликвоты раствора тетрациклина	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

9.4 Требования к отбору образцов

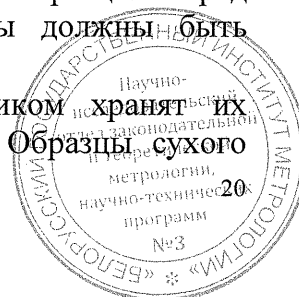
Отбор образцов для проведения измерений проводят по СТБ 1036.

9.5 Хранение образцов

Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C в течение 2 сут.

При необходимости длительного хранения образцы хранят в замороженном виде при температуре не выше минус 18°C в течение 14 сут в упаковке, обеспечивающей отсутствие изменения массовой доли воды в образце. Перед проведением подготовки проб по п. 9.6 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от 2°C до 8°C .

При невозможности хранения отобранных образцов целиком хранят их представительные порции, подготовленные 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. 9.6 до состояния, пригодного для взятия навесок. Затем от подготовленного таким образом образца отбирают для хранения порцию массой от 50 до 100 г.

Перед проведением подготовки проб замороженные порции образцов должны быть разморожены при температуре от 2 °С до 8 °С. Размороженные порции образцов сухого молока, сухой молочной сыворотки, порошка яичного далее подвергают подготовке проб согласно п. 9.6. Размороженные порции других образцов выдерживают при температуре окружающей среды, доводя их температуру от 20 °С до 25 °С, после чего тщательно перемешивают и проводят подготовку проб согласно п. 9.6, начиная со стадии отбора навесок.

9.6 Подготовка проб

9.6.1 Подготовка проб при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

9.6.1.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают. Дозатором отбирают параллельные пробы молока объемом 1 см³ и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 мм³, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают.

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

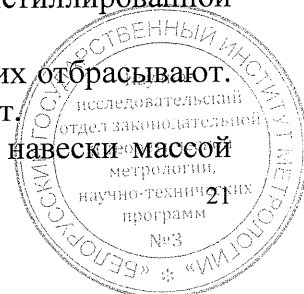
9.6.1.2 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навеске приливают небольшими порциями (от 10 до 20 см³) 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 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 г, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 мм³ и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают. Проверяют pH с помощью индикаторной бумаги. При необходимости доводят pH раствора до 7, добавляя дозатором по каплям раствор NaOH или HCl, приготовленные по пп. 9.2.1.4, 9.2.1.5.

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

9.6.1.3 Подготовка проб сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают. От образца сухого молока отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки вместимостью 10 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 9 см³ дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают до полного растворения, после чего выдерживают в течение 15 мин и перемешивают.

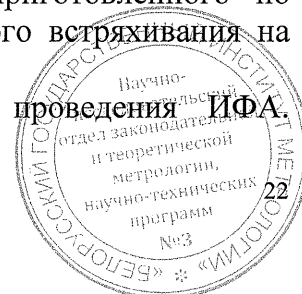
Дозатором отбирают по 1 см³ молока из каждой пробы и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 2 см³. Затем в пробирки добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТЕТ-реагента для очистки проб молока. Пробирки интенсивно встряхивают в течение 20 с и центрифугируют в следующем режиме: 4000 г, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 110 мм³, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 290 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб молока и тщательно перемешивают.

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

9.6.1.4 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают. От образца меда отбирают две параллельные навески массой 0,50 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки с закручивающимися крышками вместимостью от 15 см³ до 50 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипетки и/или дозатора 9,5 см³ 10 мМ фосфатно-солевого буфера, приготовленного по п. 9.2.1.1. Содержимое пробирок растворяют путем интенсивного встряхивания на шейкере в течение 10 мин.

Полученные подготовленные пробы используют для проведения ИФА.



Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 2 ч.

9.6.1.5 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, рыбы, креветок

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.4, от 20 °С до 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 ОХТЕТ-буфера, приготовленного по п. 9.2.1.3. Пробирки интенсивно встряхивают на шейкере в течение 30 мин.

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

В стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ приливают отмеренные дозатором 300 мм³ ТЕТ-буфера для доведения проб мяса и добавляют отобранные дозатором 200 мм³ надосадочной жидкости из пробирок с пробами, после чего перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 30 с.

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

9.6.1.6 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога, яиц

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. Образец масла, охлажденный до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Образец творога тщательно перетирают в ступке. Образец яиц гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см³ экстракционного ОХТЕТ-буфера, приготовленного по п. 9.2.1.3. Пробирки с пробами масла и сыра выдерживают на водяной бане при температуре от 70 °С до 75 °С в течение 2 мин.

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

В стеклянные пробирки вместимостью 5 см³ приливают отмеренные дозатором 800 мм³ 10 мМ фосфатно-солевого буфера, приготовленного по п. 9.2.1.1, и добавляют отобранные дозатором 200 мм³ надосадочной жидкости из пробирок с пробами, после чего перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 30 с.

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



9.6.2 Получение растворов проб молока, молока сухого, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны с фактором разбавления, увеличенным по сравнению с указанным в инструкции к набору реагентов

Если при проведении измерений в соответствии с разделом 10 полученные значения оптической плотности проб меньше, чем оптическая плотность градуировочного раствора с массовой концентрацией тетрациклина $1,60 \text{ нг/см}^3$, то в случаях, указанных в п. 11.2.1, проводят повторные измерения растворов проб с увеличенным фактором разбавления. Приготовление растворов проб с увеличенным фактором разбавления проводят согласно пп. 9.6.1, 9.6.1.2, 9.6.1.3, при этом объем используемого ТЕТ-буфера для доведения проб молока должен составлять 690 мм^3 .

9.6.3 Подготовка проб при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин»

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

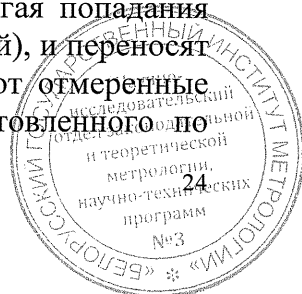
Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. Доводят температуру образца от 20°C до 25°C , выдерживая его при температуре окружающей среды.

Образец молока объемом $50\text{--}70 \text{ см}^3$ переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3 и тщательно перемешивают. Образец творога, творожного продукта тщательно перетирают в ступке. При наличии в образце частиц немолочных компонентов твердой консистенции их отбрасывают.

Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают. Молоко, сливки предварительно обезжиривают. Для этого от подготовленного как описано выше образца молока или сливок отбирают с помощью пипетки или дозатора две параллельные пробы объемом по 5 см^3 и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 . Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 10°C , 4000 g , 10 мин . При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение от 10 до 15 мин , охлаждая пробы до температуры от 7°C до 8°C , контролируя температуру термометром. Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности после центрифугирования.

Отбирают от подготовленного как описано выше образца (кроме молока, сливок) две параллельные навески массой $1,00 \text{ г}$, взвешенные с погрешностью $0,01 \text{ г}$, и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 . Навески молока, сливок массой $1,00 \text{ г}$ отбирают от каждой из обезжиренных как описано выше проб и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 .

В пробирки добавляют отмеренные дозатором 3 см^3 экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 9.2.2.1, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин . Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g , 10 мин . После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм^3 , избегая попадания жира (для чего вытирают наконечник дозатора фильтровальной бумагой), и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 , после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм^3 буферного раствора для доведения проб, приготовленного по



п. 9.2.2.3, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

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

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

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.. Проводят восстановление проб сухого молока, сухой молочной 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 указанной выше.

Затем приливают порциями от 10 до 20 см³ дистиллированную воду, нагретую до температуры 40 °С, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения сухого молока. Раствор охлаждают до температуры от 18 °С до 22 °С, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

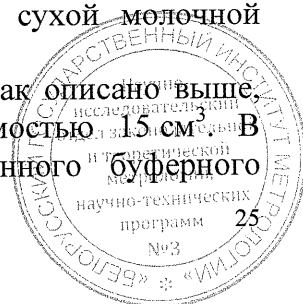
Для получения проб восстановленной сухой молочной сыворотки в мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навескам приливают порциями объемом от 10 до 20 см³ дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением 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: 10 °С, 4000 g, 10 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 - 15 мин, охлаждая пробы до температуры от 7 °С до 8 °С, контролируя температуру термометром. Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования.

Восстановленные пробы молока сухого обезжиренного и сухой молочной сыворотки обезжириванию не подвергают.

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. 9.2.2.1, и перемешивают на вортке на максимальной скорости 10 мин или на ротаторе в течение 30 мин. Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания остатков жира, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³, после чего добавляют отмеренные дозатором 300 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.2.2.3, и перемешивают в течение 1 мин на вортке.

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

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

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.4. От образцов мороженого предварительно удаляют шоколадную глазурь, вафельную оболочку и другие отделяемые немолочные компоненты.

Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды. 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.

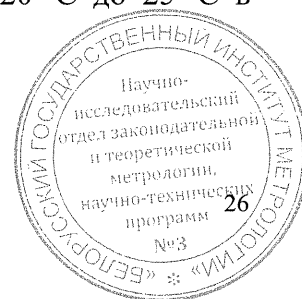
От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 3 см³ экстракционного буферного раствора, приготовленного по п. 9.2.2.1. Смесь в пробирках выдерживают в течение 2 мин на водяной бане при температуре (75 ± 1) °С и перемешивают на вортке 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 ними 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, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания жира¹ (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. 9.2.2.3, и перемешивают в течение 1 мин на вортке.

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

¹ кроме проб меда

1 Зам.



9.6.3.4 Подготовка проб сливочного масла

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.4, от 20 °С до 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. 9.2.2.1. 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, 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 800 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.2.2.3, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

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

9.6.3.5 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. 9.4, от 20 °С до 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. 9.2.2.1. 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, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 200 мм³, избегая попадания верхнего жирового слоя, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см³. В пробирки с аликвотами надосадочной жидкости добавляют отмеренные дозатором 300 мм³ буферного раствора для доведения проб, приготовленного по п. 9.2.2.3, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

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

9.6.3.6 Получение растворов проб с увеличенным фактором разбавления

Если при проведении измерений в соответствии с разделом 10 полученные значения оптической плотности подготовленных проб меньше, чем оптическая



плотность градуировочного раствора с массовой концентрацией тетрациклина $1,60 \text{ нг/см}^3$, то в случаях, указанных в п. 11.2.2, выполняют повторные измерения растворов проб с увеличенным фактором разбавления. Для этого проводят дополнительное разбавление подготовленных по п. 9.6.3 растворов проб следующим образом. В стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 переносят по 100 мм^3 исходных растворов проб, после чего в пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 буферного раствора для разбавления проб, приготовленного по п. 9.2.2.2, и перемешивают в течение 1 мин на вортексе.

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

10 Порядок выполнения измерений

10.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.4. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с п. 9.3.

10.2 Выполнение ИФА при использовании более шести стрипов одновременно

При использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин» допускается выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно.

Для этого внесение раствора антител к тетрациклину по п. 10.3.2, конъюгата по п. 10.3.5, ТМБ-субстрата по п. 10.3.8, стоп-реагента по п. 10.3.10, 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.

10.3 Процедура измерений

10.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.3.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 75 мм^3 каждого градуировочного раствора, приготовленного согласно п. 9.3.4.2 при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)» или приготовленного по п. 9.3.5.2 при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин». Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания массовых концентраций градуировочных растворов (т.е. $0,00$; $0,05$; $0,15$; $0,40$; $0,80$; $1,60 \text{ нг/см}^3$). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 75 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

10.3.2 Добавление раствора антител

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 100 мм^3 :

- раствора антител № 1 при использовании набора реагентов «MaxSignal®



для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

- раствора антител к тетрациклину при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

10.3.3 Инкубация

Помещают микротитровальный планшет в инкубатор при температуре от 20 °С до 25 °С и инкубируют в течение:

- 50 мин при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

- 55 мин при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение указанного выше времени в помещении при условиях, приведенных в разделе 7.

10.3.4 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. 9.3.3, и затем выливая промывочный раствор резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – три, 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.

10.3.5 Внесение конъюгата

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

- конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготовленного по п. 9.3.4.3, при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

- конъюгата при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

Аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.3.6 Инкубация

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

- 20 мин при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»;

- 25 мин при использовании набора реагентов ИФА антибиотик - тетрациклин».

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



разделе 7.

10.3.7 Промывка микротитровального планшета

Промывают микротитровальный планшет в соответствии с п.10.3.4.

10.3.8 Добавление ТМВ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки микротитровального 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.

10.3.9 Инкубация

Микротитровальный планшет помещают в инкубатор при температуре от 20 °С до 25 °С и инкубируют в течение 15 мин. При отсутствии инкубатора планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

10.3.10 Завершение реакции окрашивания

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

10.3.11 Измерение оптической плотности

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

11 Обработка результатов измерений

11.1 Расчет массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в пробах

Обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью программного интерфейса, выполняют с помощью программного обеспечения «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System» (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)») или Microsoft® Office Excel с применением шаблона «Шаблон для обсчета результатов ИФА антибиотик-тетрациклин» (при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик - тетрациклин») – далее «программное обеспечение».

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

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (7)$$

где B – оптическая плотность раствора тетрациклина;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с массовой



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 , $\ln C_i$ полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i = 2..6$), C_i – массовая 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

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right), \quad (8)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

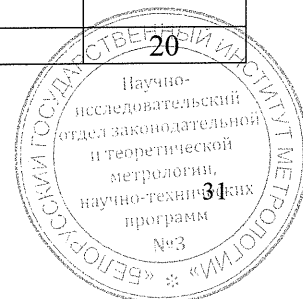
F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблицах 9, 10.

Таблица 9 – Значения факторов разбавления для подготовленных проб при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Наименование пробы	Фактор разбавления
Молоко сырое, стерилизованное, пастеризованное, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка, кефир, йогурт, сметана	4
Молоко сухое	40
Яйца, масло сливочное, сыр, творог, мед	20
Мясо, рыба, готовые к употреблению мясные продукты, креветки	10

Таблица 10 – 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, (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, рыбу, 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



проводят расчет окончательного результата измерений по п. 11.3.

11.3 Расчет окончательного результата измерений

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

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (9)$$

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

Если рассчитанное значение $\bar{X}$ оказывается меньше, чем значение предела измерений, указанного в разделе 2 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. 12.2.

В противном случае за окончательный результат измерений принимают полученное значение $\bar{X}$ при выполнении условия повторяемости по п. 13.2. Окончательный результат измерений округляют до трех значащих цифр.

12 Форма представления результатов измерений

12.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(X)) \text{ мкг/кг}, \quad (10)$$

при уровне доверия $P = 0,95$, $k=2$

где $\bar{X}$ – результат измерений массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 11;

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

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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (11)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с методикой, %, приведенная в таблице 3.

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

12.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ} , указанный в разделе 2, то дается односторонняя оценка массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием предела измерений в виде



$$\text{менее } X_{LQ}, \quad (12)$$

где X_{LQ} – значение предела измерений, равное нижней границе диапазона измерений согласно разделу 2, мкг/кг.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , указанное в разделе 2, то дается односторонняя оценка массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в виде

$$\text{более } X_{HL}, \quad (13)$$

где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 2, мкг/кг.

13 Контроль точности результатов измерений

13.1 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.

13.2 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 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 окончательного результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (9).

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, приведенное в таблицах 11, 12, %.

При невыполнении условия (14) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

13.3 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 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\overline{X}_1, \overline{X}_2$ одного и того же образца согласно разделу 10, варьируя факторы промежуточной прецизионности («оператор», «время») и обеспечивая контроль повторяемости по п. 13.2. За результат измерений принимают среднее арифметическое двух значений $\overline{X}_1, \overline{X}_2$

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

при их соответствии условию

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

где $CD_{абс}$ – абсолютное значение критической разности, мг/кг, рассчитываемое по формуле

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

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблицах 11, 12, %.

13.4 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 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения проб одного и того же образца согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 13.2.

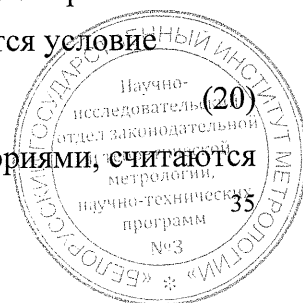
Рассчитывают среднее арифметическое значение $\overline{\overline{X}}$, мг/кг, результатов измерений двух лабораторий $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ соответственно

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

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 $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (19), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

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

где $\bar{\bar{X}}$ – среднее арифметическое результатов измерений двух лабораторий, мкг/кг;
 k – коэффициент, равный 1,2;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблицах 11, 12.

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

Таблица 11 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения тетрациклина (группы тетрациклинов)»

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн.}$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	12	13	12
Молоко сухое	13	16	14
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	6	15	13
Масло сливочное, сыр, яйца	9	15	13
Творог	11	13	12
Мясо, готовые к употреблению мясные продукты, рыба, креветки	15	22	19
Мед	10	14	12
Йогурт, кефир, сметана	16	17	16



Таблица 12 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик – тетрациклин»

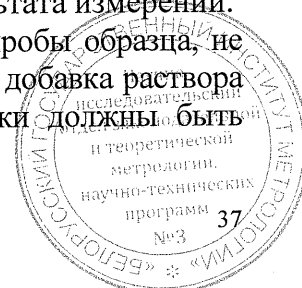
Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн.}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное, ультрапастеризованное), сливки, кисломолочная продукция (ряженка, айран, простокваша, творог, кефир, ацидофилин с наполнителями и без), творожные продукты (в 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 продукция (йогурт, варенец, сметана) молоко сухое, молочная сыворотка, сухая молочная сыворотка, сухая молочная смесь для детского питания, сыр, стуженное молоко, мороженое на молочной основе, яйца, яичный порошок, мед	22	17	17
Мясо, готовые к употреблению 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

13.5 Контроль правильности

13.5.1 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 загрязненных 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 массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в подготовленных таким образом образцах без добавки должна быть не более значения, соответствующего градуировочному раствору с концентрацией $0,05 \text{ нг/см}^3$. Требуемые значения оценок массовой доли в образцах рассчитывают по формуле (9) на основании полученных согласно разделу 10 результатов измерений двух параллельных проб каждого такого образца без проведения контроля повторяемости по п. 13.2 и интерпретации результатов по п. 11.3. Допускается получение вышеуказанных значений оценок в образцах без добавки с помощью другой аттестованной (стандартизованной) методики, имеющей соответствующий предел измерения (обнаружения). В качестве образцов, в которые вносятся добавки, могут быть также использованы контрольные (референсные) образцы, свойства которых, в том числе приписанное изготовителем значение массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов, соответствуют указанным выше условиям.

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

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (22)$$

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 доли не превышает 3 %.

13.5.2 Проведение контрольной процедуры

При проведении контрольной процедуры получают два результата измерений параллельных проб ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения, $\overline{X_K}$, мкг/кг, принимают результат измерения массовой доли антибиотиков группы тетрациклинов в ОК, рассчитанный по формуле (19) при выполнении условия повторяемости по п. 13.2.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X_K} - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot X_{am}, \quad (23)$$

где $K_{отн.}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблицах 11, 12.

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



При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (23) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.6 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 измерений показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости согласно разделу 2.

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. 13.5.1. Рекомендуется вносить добавку тетрациклина в образцы для контроля на уровне значений массовой доли в рабочих пробах.

13.6.1 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

$$CL = d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (24)$$

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

- предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r; \quad (25)$$

- границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r;$$

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 (27), оформление Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (27)$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5].

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формуле

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N W_i / N}{d_2}, \quad (28)$$

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

d_2 – коэффициент, $d_2 = 1,128$.

13.6.2 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

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (29)$$

где N – количество измерений для расчета значений центральной линии и границ КК;
 Rec_i – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i -го измерения пробы с добавкой тетрациклина, по формуле

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (30)$$

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

$$UCL = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}; \quad (31)$$

- границы регулирования

$$UCL = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC}, \quad (32)$$

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



$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}}. \quad (33)$$

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 измерений ОК в соответствии с методикой, расчет фактических значений коэффициента извлечения Rec_i по формуле (30), оформление 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 ВУ 191218537.007-2015 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



