

Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственное объединение «Иммунотэкс»

**Методика измерений массовой концентрации хлорамфеникола
в продукции животного происхождения методом иммуноферментного
анализа с использованием тест системы производства «Иммунотэкс»**

Аттестована

Федеральным бюджетным учреждением «Государственный региональный центр
стандартизации, метрологии и испытаний в Ростовской области»
(ФБУ «Ростовский ЦСМ»)

Ставрополь
2020

СВЕДЕНИЯ О РАЗРАБОТКЕ

РАЗРАБОТАНА: Научным отделом ООО НПО «Иммунотэкс»
ИСПОЛНИТЕЛЬ: Общество с ограниченной ответственностью
Научно-производственное объединение «Иммунотэкс»
(ООО НПО «Иммунотэкс»)

Адрес: 355021, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, 177 Г, стр.1
Телефоны: +7(8652)28-34-60
Факс: +7(8652)28-34-60
e-mail:market@immunotex.ru

Фамилия, имя, отчество, должность руководителя организации:
Директор ООО НПО «Иммунотэкс» Батурин Михаил Владимирович

СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

АТТЕСТОВАНА: Федеральным бюджетным учреждением «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в Ростовской области» (ФБУ «Ростовский ЦСМ»)

Аттестат аккредитации на право аттестации методик (методов) измерений и проведения метрологической экспертизы документов № 01.00281-2013 от 03 декабря 2013 года.

Свидетельство об аттестации методики измерений
№ 029-01.00281-2013-2020 от 25.09.2020 г.

Адрес:344000, г. Ростов-на-Дону, пр. Соколова, 58/173
Телефон: (863)264-19-74
Факс: (863)291-08-02
e-mail: info@rostcsm.ru

Фамилия, имя, отчество, должность руководителя организации:
Генеральный директор ФБУ «Ростовский ЦСМ» Красавин Александр Васильевич

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ

Регистрационный код методики измерений по Федеральному реестр

Содержание

1 Область применения	4
2 Нормативные ссылки	4
3 Приписанные характеристики погрешности измерений и ее составляющих	5
4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, растворы и материалы	6
4.1 Средства измерений	6
4.2 Вспомогательное оборудование, лабораторная посуда и материалы	7
4.3 Реактивы и растворы	7
4.4 Стандартные образцы	8
4.5 Тест-система для иммуноферментного анализа	8
5 Сущность метода	9
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	9
7 Требования к квалификации оператора	10
8 Условия выполнения измерений	10
9 Отбор проб	11
10 Подготовка к выполнению измерений	11
10.1 Подготовка оборудования и стеклянной посуды	11
10.2 Подготовка и хранение Тест-системы	11
10.3 Подготовка растворов и реактивов	11
10.4 Подготовка образцов для испытаний (измерений)	12
11 Выполнение измерений	19
12 Обработка (вычисление) и оформление результатов измерений	20
12.1 Вычисление результатов измерений	21
12.2 Оформление результатов измерений	23
13 Контроль качества результатов измерений	24
14 Проверка приемлемости результатов, полученных в условиях воспроизводимости	25

1 Область применения

1.1 Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации хлорамфеникола в продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы производства «Иммунотэкс».

1.2 Настоящий документ регламентирует порядок определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием «Набора для определения хлорамфеникола методом ИФА» в продуктах животного происхождения, в том числе в молоке (сухое, цельное), молочных продуктах (творог, сливки, йогурт, пахта и сыворотка, кефир, сметана, сыр, масло сливочное), в тканях (рыба, креветки, печень), кишечной оболочке, сыворотке и моче свиньи, яйцах, меде, кормах и воде.

1.3 Настоящая методика измерений предназначена для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и других организаций и ведомств, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. Методика измерений методом иммуноферментного анализа обеспечивает высокую чувствительность, специфичность, точность и используется с различным целевым назначением (арбитраж, скрининг).

1.4 Содержание хлорамфеникола (левомицетина) в продуктах животного происхождения регламентируется СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» и ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции». Предел обнаружения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции методом иммуноферментного анализа составляет 0,0000125 мг/кг (мг/дм³).

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

1 ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции».

2 СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».

3 ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования (с Изменением № 1).

4 ГОСТ 12.4.009-83 ССБТ. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание.

5 ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

6 ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

7 ГОСТ Р 12.1.019-09 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

8 ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

9 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

10 РМГ 61-2010 ГСИ Показатели точности, правильности, прецизионности количественного химического анализа. Методы оценки.

11 РМГ 76-2014 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

12 МИ 2881-2004 ГСИ. Методики количественного химического анализа. Процедуры проверки приемлемости результатов анализа.

13 ГОСТ 25336-82. Посуда мерная лабораторная стеклянная.

14 ГОСТ 1770-74. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

3 Приписанные характеристики погрешности измерений и ее составляющих

3.1 Методика измерений обеспечивает получение результатов измерений с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в Таблице 1.

Таблица 1 - Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, воспроизводимости, точности методики при принятой вероятности $P=0,95$

Продукты животного происхождения	Диапазон измерений массовой концентрации хлора мфеникола в определяемых продуктах, мг/кг	Показатель точности (гра ницы суммарной погрешности), при вероятности $P=0,95\%$ $\pm\delta$, %	Показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Степень извлечения вещества, %
1	2	3	4	5	6
Рыба	0,0000125 – 0,00101	1	1,8	1,30	85%
Креветки	0,0000125 – 0,00101	1	1,7	1,35	85%
Печень, мясо	0,0000125 – 0,00101	2	2,1	1,71	85%
Мясо	0,0000125 – 0,00101	1	3,5	2,41	75%
Яйца	0,00005 - 0,00405	22	2,9	0,54	90%
Сыр	0,000025 – 0,00203	23	3,1	0,78	75%
Масло сливочное	0,00013 - 0,01056	23	3,1	0,76	75%
Мед	0,0000125 – 0,00101	8	4,2	1,66	85%
Молоко	0,0000125 – 0,00101	7	3,1	1,47	75%
Сухое молоко	0,000025 – 0,00203	7	3,1	1,32	75%

Сливки	0,0000125 – 0,00101	7	3,1	2,49	75%
Кефир	0,0000125 – 0,00101	8	2,9	1,49	85%
Йогурт	0,0000125 – 0,00101	7	3,0	1,66	85%
Пахта и сыворотка	0,0000125 – 0,00101	8	2,9	1,44	85%
Сметана	0,000025 – 0,00203	7	3,5	2,40	75%
Творог	0,000025 – 0,00203	8	3,5	2,86	75%
Моча (свиньи)	0,000025 – 0,00203	13	4,5	1,59	70%
Сыворотка (свиньи)	0,000025 – 0,00203	10	3,1	2,06	70%
Кишечная оболочка	0,000025 – 0,00203	12	3,0	0,37	85%
Корма	0,000025 – 0,00203	10	4,1	0,08	75%
Вода	0,00005 - - 0,00405	14	2,1	0,70	90%

3.2 Значения показателя точности методики используют при:

- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке качества проведения измерений в лаборатории;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики

выполнения измерений в конкретной лаборатории.

4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, растворы и материалы

4.1 Средства измерений

4.1.1 Фотометр планшетный вертикального сканирования, с фильтрами, соответствующими длинам волн 450 нм и 630 нм «Униплан», «Пикон», «Мультискан» или иного типа с теми же характеристиками.

4.1.2 Дозаторы пипеточные автоматические одноканальные с переменным объемом (от 0,02 до 0,2) см³ и (от 0,1 до 1) см³, с допустимой относительной погрешностью не более ±5 %, с одноразовыми наконечниками.

4.1.3 Дозаторы пипеточные автоматические многоканальные с переменным объемом (от 0,05 до 0,3) см³, с допустимой относительной погрешностью не более ±1,5 %, с одноразовыми наконечниками.

4.1.4 Весы неавтоматического действия 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г.

4.1.5 Анализатор потенциометрический или pH-метр, погрешность измерений pH±0,01.

4.1.6 Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные, вместимостью (25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000) см³.

ГОСТ OIML R 76-1-2011

ГОСТ 1770-74

4.1.7 Градуированные пипетки 2-го класса точности
емкостью (1, 2, 5, 10) см³. ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81)

Примечание – Допускается использование других типов средств измерений, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в п. 4.1.

4.2 Вспомогательное оборудование, лабораторная посуда и материалы

4.2.1 Баня водяная лабораторная с терморегулятором,
обеспечивающая нагрев не менее (50±1) °С

ГОСТ 12026-76

4.2.2 Бумага фильтровальная лабораторная

4.2.3 Баня водяная лабораторная с терморегулятором,
обеспечивающая нагрев не менее (50±1) °С

4.2.4 Бумага фильтровальная лабораторная

ГОСТ 12026-76

4.2.5 Термостат, позволяющий поддерживать рабочую
температуру 37 °С с отклонением от заданной не более ±1 °С

ТУ 9452-002-00141798-97

4.2.6 Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов
или миксер

4.2.7 Измельчитель-гомогенизатор или фарфоровые ступки с
пестиками

4.2.8 Устройство для испарения экстрактов или роторный
испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом
и рабочим диапазоном температур до 60 °С

4.2.9 Холодильник бытовой электрический

ГОСТ 16317-87

4.2.10 Центрифуга настольная с устанавливаемым
относительным центробежным ускорением до 4000 об/мин и
возможностью охлаждения

4.2.11 Центрифуга настольная с устанавливаемым
относительным центробежным ускорением до 20000 об/мин

4.2.12 Шейкер лабораторный для пробирок типа «Вортекс»

4.2.13 Принтер

4.2.14 Пробирки типа «Эппендорф» емкостью 1,5 — 2,0
см³

4.2.15 Пробирки полипропиленовые центрифужные с
завинчивающимися крышками емкостью 15 см³

4.2.16 Пластиковые ванночки для реагентов

ГОСТ 25250-88

4 2 17 Перчатки медицинские одноразовые

ГОСТ Р 52239-2004 (ИСО
11193-1:2008)

Примечание – Допускается использование других типов посуды, вспомогательного оборудования и материалов, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в п.4.2.

4.3 Реактивы и растворы

4.3.1 Вода дистиллированная

ГОСТ 6709-72

4.3.2 Дезинфицирующее средство на основе ЧАС
(четвертичных аммониевых солей), спиртов, третичных
аминов

ГОСТ Р 56990-2016

4.3.3 Этилацетат, сорт высший

ГОСТ 8981-78

4.3.4 Н-гексан, ч	ТУ 2631-025-44493179-98
4.3.5 Ацетонитрил, чда	ТУ 6-09-3534—87
4.3.6 Метанол, хч	ГОСТ 6995-77
4.3.7 Натрий ацетат безводный, хч	ГОСТ 199-78
4.3.8 Натрия гидроксид (NaOH), хч	ГОСТ 4328-77
4.3.9 Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный (Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O), хч	ГОСТ 4172-76
4.3.10 Натрий фосфорнокислый однозамещенный 12-водный (NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O), хч	ГОСТ 245-76
4.3.11 Натрий хлористый (NaCl), хч	ГОСТ 4233-77
4.3.12 Уксусная кислота	ГОСТ 61-75
4.3.13 Натрий нитропруссидный (Na ₂ Fe(CN) ₅ NO×2H ₂ O)	ТУ 6-09-4224-76
4.3.14 β-глюкуронидаза (активность ≥1 000 000 единиц/г)	
4.3.15 Цинк сернокислый 7-водный (ZnSO ₄ ×7 H ₂ O), хч	ГОСТ 4174-77

Примечание - Допускается использование реактивов и растворов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, в том числе импортных, с квалификацией не ниже указанной в п. 4.3.

4.4 Стандартные образцы

Комплект стандартных растворов хлорамфеникола (левомецетина) со следующими концентрациями: 0, 25, 75, 225, 675, 2025 нг/дм³ по 1,0 см³

4.5 Тест- система для иммуноферментного анализа

4.5.1 Компоненты набора Тест-системы

Набор для количественного определения хлорамфеникола (левомецетина) по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включающий следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсibilизированных хлорамфениколом (левомецетином), в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Комплект стандартных растворов хлорамфеникола (левомецетина) со следующими концентрациями: 0, 25, 75, 225, 675, 2025 нг/дм³ по 1,0 см³ - 6 шт.
3. Конъюгат с пероксидазой хрена, готовый к употреблению - 11 см³.
4. Рабочий раствор антител к хлорамфениколу (левомецетину) - 5,5 см³.
5. Субстрат реагент А, содержит пероксид карбамида - 6 см³.
6. Субстрат реагент В, содержит тетраметилбензидин (ТМБ) - 6 см³.
7. Стоп-реагент, содержащий раствор 1н серной кислоты - 6 см³.
8. Буфер для восстановления образцов, 2-х кратный концентрат - 50 см³.
9. Промывающий буфер, приготовленный на основе одно- и двузамещенного фосфата натрия с добавлением твин-20, рН 7,4±0,5, 20-ти кратный концентрат - 40 см³.
10. Пленка для заклеивания планшета - 3 шт.
11. Фольгированный зип-пакет - 1 шт.
12. Трафарет анализа - 1 шт.
13. Инструкция - 1 шт.

Набор рассчитан на проведение анализа в 2-х повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

4.5.2 Характеристики набора Тест-системы

4.5.2.1 Чувствительность.

Минимальная концентрация хлорамфеникола (левомецетина), определяемая с помощью набора, составляет (0,000025 мг/кг (дм³)).

4.5.2.2 Степень извлечения - >70%.

4.5.2.3 Перекрестная реактивность:

Хлорамфеникол - 100%, тиамфеникол/флорфеникол - <0,1%.

5 Сущность метода

Измерение концентрации хлорамфеникола (левомецетином) выполняют методом иммуноферментного анализа.

Планшет в наборе сорбирован хлорамфениколом (левомецетином).

Принцип метода основан на конкуренции в ходе реакции хлорамфеникола (левомецетина) в образцах или стандартах с хлорамфениколом (левомецетином) на твердой фазе за центры связывания с антителами к хлорамфениколу (левомецетину). В каждую лунку планшета добавляется конъюгат с пероксидазой хрена, не связавшиеся молекулы которого удаляются на этапе отмывки, а также субстрат для ферментативной реакции с изменением цвета. Существует обратная зависимость между значениями оптической плотности образцов и концентрацией хлорамфеникола (левомецетина). Концентрацию хлорамфеникола (левомецетина) в образцах рассчитывают с помощью стандартной кривой.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

6.1 Исследования с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсическими, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-систем.

Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента и ТМБ, в используемых концентрациях не являются токсичными. Данные реагенты обладают раздражающим действием. В случае попадания какого-либо из этих реагентов на кожу или слизистые покровы следует промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

6.2 При выполнении измерений с помощью фотометра и работе с другими электроприборами необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ Р 12.1.019 и четко следовать указаниям инструкции по эксплуатации прибора.

6.3 Помещение должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

6.4 Помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. В помещении, где установлены приборы, не должны храниться концентрированные кислоты и проводиться работы с ними. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать установленных предельно допустимых концентраций в соответствии с ГОСТ 12.1.005.

6.5 Исполнители должны быть проинструктированы о мерах предосторожности при работе с химическими реактивами, электрооборудованием.

6.6 Специальных требований по экологической безопасности не предусмотрено. Все образующиеся в результате выполнения работ отходы (отработанные растворы, реактивы и пр.) утилизируют согласно внутренней Инструкции по технике безопасности.

7 Требования к квалификации операторов

Выполнение измерений и обработку полученных результатов должно выполнять лицо с высшим или средним специальным образованием, прошедшее соответствующую инструктажи подготовку и имеющее навыки работы в области ИФА. Данный персонал должен быть ознакомлен с руководством по эксплуатации планшетного фотометра, освоившего методику испытаний и показавшего удовлетворительные результаты при выполнении процедур контроля качества результатов измерений.

8 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды (25 ± 5) °С;
- атмосферное давление (84,0 - 106,7) кПа или (630-800) мм рт.ст.;
- влажность воздуха (40 – 80) % при температуре 25°С;
- напряжение питания сети и частота питающего тока в соответствии с технической документацией на оборудование.

9 Отбор проб

Из образца продукта животного происхождения отбирают пробы для определения содержания хлорамфеникола (левомецетина) в соответствии с требованиями, предъявляемыми к отбору проб конкретного продукта. Пробы для испытаний готовят непосредственно перед определением

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Подготовка оборудования и стеклянной посуды

Перед началом работы рабочие поверхности столов и оборудования обрабатывают 70% этиловым спиртом (не допускать использование перекиси водорода и хлорсодержащих дезинфицирующих растворов). Лабораторную стеклянную посуду моют чисто специальными растворами, многократно промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу.

Обязательно использование сменных наконечников для дозаторов во избежание перекрестной контаминации в ходе анализа.

Подготовку и проверку фотометра и рН-метра проводят в соответствии с руководством по эксплуатации приборов.

10.2 Подготовка и хранение Тест-системы

Тест-системы для ИФА хранят при температуре (2-8) °С, не допуская подмораживания компонентов. Использовать набор можно только в пределах срока годности.

Перед использованием извлекают набор из холодильника, вскрывают упаковку и выдерживают все реагенты при комнатной температуре (18-25)°С в течение 30 минут (не менее).

10.3 Приготовление растворов и реактивов

Приготовление 0,36М раствора нитропруссид натрия

Навеску 10,7 г нитропруссид натрия 2-водного ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \times 2\text{H}_2\text{O}$) разводят в мерной колбе объемом 100 см³ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление 1,04М раствора сернокислого цинка

Навеску 29,8 г цинка сернокислый 7-водного ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) разводят в мерной колбе объемом 100 см³ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление 20М буферного раствора (PBS-буфер)

Навески 1,1 г натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного, 3,22 г натрия фосфорнокислого двухзамещенного 12-водного и 8,77 г натрия хлористого растворяют в объеме 800-900 см³ дистиллированной воды, доводят рН до 7,4 0,5н. раствором гидроокиси натрия и доводят в мерной колбе объемом 1000 см³ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление 0,1М натрий-ацетатного буфера с рН 4,8

Навеску 2,4 г ацетата натрия растворяют в объеме 300-400 см³ дистиллированной воды, добавляют 1,2 см³ уксусной кислоты до рН 4,8 и доводят в мерной колбе объемом 500 см³ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление водного раствора ацетонитрила

Разводят ацетонитрил дистиллированной водой в соотношении: ацетонитрил (V): вода (V) = 84: 16 (например, смешивают 84 см³ ацетонитрила и 16 см³ дистиллированной воды для приготовления 100 см³ раствора).

Приготовление 0,5н раствора гидроксида натрия

Навеску 20г гидроксида натрия, разводят в мерной колбе объемом 1000 см³ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление 10%-го раствора метанола

Для получения 10%-го раствора метанола отбирают 10 см³ метанола в мерную колбу объемом 100 см³ и разводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление 20%-го раствора метанола

Для получения 20%-го раствора метанола отбирают 20 см³ метанола в мерную колбу объемом 100 см³ и разводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Приготовление буферного раствора для восстановления образцов

Для приготовления готового к использованию буферного раствора для восстановления образцов растворяют одну часть 2-кратного концентрата в одной части дистиллированной воды (например, смешивают 25 см³ концентрата и 25 см³ дистиллированной воды для приготовления 50 см³ раствора, готового к употреблению). Тщательно перемешивают. Готовый раствор может храниться при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

Примечание: если анализируемый образец вода, то разбавление концентрата не требуется.

Приготовление промывающего буферного раствора

Для приготовления готового к использованию промывающего буферного раствора растворяют одну часть 20-кратного концентрата в 19 частях дистиллированной воды (например, смешивают 25 см³ концентрата и 475 см³ дистиллированной воды для приготовления 500 см³ раствора, готового к употреблению). Тщательно перемешивают. Готовый раствор может храниться при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

10.4 Подготовка образцов для испытаний (измерений)

Подготовка образцов тканей: рыбы, креветок, печени, мяса.

1) Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 3 г измельченного гомогената в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 3 см³ дистиллированной воды, перемешивают, затем добавляют 6 см³ этилацетата и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

3) Отбирают 2 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

4) Растворяют сухой остаток в 1 см³ н-гексана, добавляют 0,5 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают на вортексе в течение 30 секунд. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин при температуре (20-25) °С.

5) Удаляют верхний органический слой н-гексана, берут 0,05 см³ жидкости из нижнего слоя для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 0,5; минимально определяемая концентрация 0,0000125 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов сыворотки (свиной).

1) Берут 1 см³ сыворотки в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 2 см³ этилацетата, тщательно перемешивают встряхиванием в течение 1 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин при температуре 25 °С.

2) Отбирают надосадочную жидкость в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

3) Растворяют остаток в 1 см³ н-гексана, добавляют 1 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают на вортексе в течение 30 секунд. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин при температуре 25 °С.

4) Удаляют верхний органический слой н-гексана, берут 0,05 см³ из нижнего слоя для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 1; минимально определяемая концентрация 0,000025 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов мочи (свиньи).

1) Берут 2 мл мочи в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, тщательно перемешивают с 0,5 см³ натрий-ацетатного буфера (0.1М, рН4.8), затем добавляют 0,04 см³ β-глокуронидазы, тщательно перемешивают и гидролизуют при 37 °С более 2 часов (можно в течение ночи).

2) Доводят полученный раствор до температуры (20-25) °С, добавляют 8 см³ этилацетата, тщательно перемешивают в течение 1 мин. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25 °С).

3) Отбирают 4 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

4) Растворяют сухой остаток в 1 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

5) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 1; минимально определяемая концентрация 0,000025 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов меда

1) Взвешивают 2 г меда в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 4 см³ дистиллированной воды до растворения, затем добавляют 4 см³ этилацетата и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

2) Отбирают 2 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

3) Растворяют сухой остаток в 0,5 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

4) Берут 0,05 см³ раствора для испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 0,5; минимально определяемая концентрация 0,0000125 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов кишечной оболочки

1) Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 1 г гомогената в центрифужную пробирку объемом 15 см³, добавляют 10 см³ этилацетата и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

3) Отбирают 5 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60)°С.

4) Растворяют сухой остаток в 1 см³ н-гексана, добавляют 0,5 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают на вортексе в течение 30 секунд. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин при температуре (20-25)°С.

5) Удаляют верхний органический слой н-гексана, берут 0,05 см³ жидкости из нижнего слоя для анализа.

Примечание: фактор разведения образцов 1; минимально определяемая концентрация 0,000025 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов молока

1) Центрифугируют молоко при 4000 об/мин в течение 10 мин при 15 °С. Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

2) Отбирают 5 см³ обезжиренного молока в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 0,25 см³ 0,36М раствора нитропруссиды натрия и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек, затем добавляют 0,25 см³ 1,04М раствора сернокислого цинка и снова тщательно перемешивают в течение 30 сек, после чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 15°C.

3) Отбирают 2,2 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, добавляют 4 см³ этилацетата и тщательно перемешивают на вортексе в течение 2 мин, после чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25)°С.

4) Отбирают 2 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60)°С.

5) Растворяют сухой остаток в 0,5 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

6) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 0,5; минимально определяемая концентрация 0,0000125 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов сухого молока

1) Взвешивают 2г образца сухого молока в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 10 см³ дистиллированной воды. Затем добавляют 1 см³ 0,36М раствора нитропруссиды натрия и 1 см³ 1,04 М раствора сернокислого цинка. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 2 мин и центрифугируют при 4000 об /мин в течение 10 минут при 15°C.

2) Отбирают 3.6 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, добавляют 6 см³ этилацетата и тщательно перемешивают на вортексе в течение 5 мин, после чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

3) Отбирают 4 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

4) Растворяют остаток в 0,4 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

5) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения 1; минимально определяемая концентрация 0,000025 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов яиц

1) Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 3г гомогената в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 9

см³ ацетонитрила водного раствора, тщательно перемешивают встряхиваем в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при 15 °С.

2) Отбирают 3 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, добавляют 3 см³ дистиллированной воды и 4,5 см³ этилацетата. Тщательно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и затем центрифугируют при 4000 об /мин в течение 10 мин при 15 °С.

3) Отбирают всю надосадочную жидкость в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

4) Растворяют сухой остаток в 1 см³ н-гексана, добавляют 2 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают на вортексе в течение 30 сек. Центрифугируют при 4000 об /мин в течение 5 мин при комнатной температуре (20-25) °С.

5) Удаляют верхний органический слой н-гексана, берут 0,05 см³ жидкости из нижнего слоя для анализа.

Примечание: фактор разведения 2; минимально определяемая концентрация 0,00005 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов корма

1) Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 2 г измельченного гомогената в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 2 см³ дистиллированной воды, затем добавляют 6 см³ этилацетата и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 2 мин. После чего центрифугируют при 4000 об /мин в течение 10 мин при 15 °С.

3) Отбирают 3 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

4) Растворяют сухой остаток в 1 см³ н-гексана, добавляют 1 см³ буфера для восстановления, тщательно перемешивают на вортексе в течение 30 сек. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 5 мин при температуре (20-25) °С.

5) Удаляют верхний органический слой н-гексана, берут 0,05 см³ жидкости из нижнего слоя для анализа.

Примечание: фактор разведения 1; минимально определяемая концентрация 0,000025 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов молочных продуктов: йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, пахта и сыворотка, сливки

1) Образцы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси, доводя значение рН до $7,0 \pm 0,5$. При наличии в продукте фруктов отбрасывают частицы твердой консистенции, отбирают жидкую фракцию.

2) Взвешивают 10,0 г образца в колбу вместимостью 100 см³ с плотно закрывающейся пробкой, приливают 8,0 см³ 20М буферного раствора и перемешивают. Далее добавляют 1 см³ 0,36М раствора нитропруссиды натрия и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 30 сек, затем добавляют 1 см³ 1,04М раствора сернокислого цинка и снова тщательно перемешивают в течение 30 сек на вортексе, после чего центрифугируют при 4000 об/мин 10 мин при температуре 4 °С.

3) Отбирают 4 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, добавляют 8 см³ этилацетата и тщательно перемешивают на вортексе в течение 2 мин, после чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

4) Отбирают 4 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

5) Растворяют сухой остаток в 1 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

6) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 0,5; минимально определяемая концентрация 0,0000125 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов молочных продуктов: творог, сметана

1) Взвешивают 5,0 г образца в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, прибавляют 15 см³ 10%-го раствора метанола и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

2) Центрифугируют смесь в течение 15 мин при 4000 об /мин при температуре не выше 4 °С. Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки.

3) Отбирают 4 см³ из обезжиренной средней части в другую чистую центрифужную пробирку, добавляют 8 см³ этилацетата и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, после чего центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

4) Отбирают 4 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

5) Растворяют сухой остаток в 0,5 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

б) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 1; минимально определяемая концентрация 0,000025 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов молочных продуктов: масло сливочное

1) Взвешивают 2,0 г масла в центрифужную пробирку объёмом 15 см³, расплавляют масло на водяной бане при температуре (40 ± 1) °С. Прибавляют 2 см³ н-гексана и перемешивают тщательно на вортексе в течение 10-15 с.

2) Прибавляют 1 см³ 20 %-го раствора метанола и снова тщательно перемешивают на вортексе в течение 10—15 с, затем встряхиванием в течение 10 мин. Центрифугируют в течение 10 мин при 3 000 об/мин при температуре не выше 4 °С.

3) Отбирают 0,7 см³ из нижней водной фазы в пробирку типа эппендорф на 1,5—2 см³ и помещают пробирку на лед на 10 мин. После чего центрифугируют в течение 5 мин при 20000 об/мин при температуре (20-25) °С.

4) Отбирают нижнюю водную фазу в пустую чистую пробирку и разбавляют буфером для восстановления образцов в соотношении 1:4,5 (например: 0,2 см³ нижней фазы + 0,7 см³ буфера для восстановления образцов).

5) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 5,2; минимально определяемая концентрация 0,00013 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов молочных продуктов: сыр

1) С поверхности образца сыра удаляют плесневый налет (при наличии). Полностью гомогенизируют всё количество представленного образца в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

2) Взвешивают 10,0 г образца в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, прибавляют 30 см³ 10 %-го раствора метанола, тщательно перемешивают и инкубируют на водяной бане при температуре (40 ± 1) °С в течение 10 мин, встряхивая интенсивно минимум 3 раза во время инкубации. После чего центрифугируют в течение 15 мин при 4000 об/мин при температуре не выше 4 °С.

3) Отбирают 3,5 см³ из нижней водной фазы в другую чистую центрифужную пробирку, добавляют 7 см³ этилацетата и тщательно перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, после чего центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин при температуре (20-25) °С.

4) Отбирают 3,5 см³ надосадочной жидкости в другую чистую центрифужную пробирку, высушивают досуха при помощи азотного роторного испарителя или водяной бани при температуре (50-60) °С.

5) Растворяют сухой остаток в 0,5 см³ буфера для восстановления образцов, тщательно перемешивают.

6) Берут 0,05 см³ раствора для анализа.

Примечание: фактор разведения образцов 1; минимально определяемая концентрация 0,000025 мг/кг.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного образца в 33 раза (например, 0,1 см³ экстракта + 3,2 см³ буфера для восстановления образцов).

Подготовка образцов воды

1) Берут 0,5 см³ образца воды в центрифужную пробирку, объемом 15 см³, добавляют 0,5 см³ буфера для восстановления образцов 2-х кратный концентрат, тщательно перемешивают встряхиванием в течение 1 мин.

2) Берут 0,05 см³ раствора для проведения испытаний.

Примечание: фактор разведения образцов 2; минимально определяемая концентрация 0,00005 мг/кг.

11 Выполнение измерений

Общие требования

1. Раствор субстрата/хромогена светочувствителен, поэтому необходимо избегать попадания на него прямого света. При появлении окрашивания раствора субстрата/хромогена в голубоватый цвет реагент к работе непригоден.

2. Запрещается использовать реагенты из наборов разных серий или наборов других производителей.

Подготовка тест-системы к использованию

1 Перед использованием извлекают набор из холодильника, вскрывают упаковку и выдерживают все реагенты при температуре (18-25) °С в течение времени не менее 30 минут. Если в концентратах буфера образовались кристаллы, растворяют их путём встряхивания при комнатной температуре перед разведением этих реагентов.

2 Перед выполнением испытания из планшета извлекают необходимое количество стрипов (8 микролунок скрепленных в одну полоску). Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить в холодильник при температуре (2-8) °С.

3 Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

4 После использования реагенты тест-системы сразу убирают в холодильник.

5 На всех стадиях необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

6 Для каждого реактива и раствора используют отдельные съемные наконечники автоматических дозаторов. Внесение растворов в лунки проводят осторожно, не касаясь наконечниками их дна и стенок.

7 Испытания каждого исследуемого раствора экстрактов исследуемых образцов и градуировочных растворов выполняются в двукратной повторности.

Алгоритм проведения исследования

При выполнении измерений концентрации хлорамфеникола проводят следующие операции:

1 Нумерация. Вставляют в рамку планшета необходимое количество стрипов. Записывают положение лунок со стандартами и исследуемыми образцами на графаре анализатора. Стандарты и образцы необходимо раскапывать в дублях.

2 Добавление образцов и антители: добавляют по 0,05 см³ каждой концентрации раствора стандарта и образцов в выбранные пары лунок, затем добавляют по 0,05 см³ рабочего раствора антители во все лунки. Заклеивают планшет пленкой и осторожно перемешивают в течение 5 секунд. Инкубируют в течение 30 минут при 25 °С в темном месте.

3 Промывка: осторожно убирают пленку, удаляют жидкость из каждой лунки путем стряхивания, тщательно выбивая капельки жидкости, оставшиеся в лунке. Немедленно заливают в каждую лунку по 0,3 см³ промывающего буферного раствора. Осторожно перемешивают. Удаляют жидкость из лунок путем стряхивания. Повторяют процедуру промывки 5 раз с интервалом времени в 30 секунд. Переворачивают планшет на чистую фильтровальную бумагу и путем постукивания рамки по столу удаляют остатки жидкости (если в лунках остались пузырьки, используйте чистые наконечники чтобы убрать их).

Примечание: не допускать высыхания лунок в процессе анализа.

4 Добавление конъюгата: добавляют по 0,1 см³ конъюгата в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре 25 °С в темном месте.

5 Промывка: повторить пункт 3.

6 Ферментативная реакция: после тщательной промывки добавляют по 0,05 см³ раствора субстрата А в каждую лунку, а затем добавляют по 0,05 см³ раствора субстрата В в каждую лунку. Осторожно покачивают планшет в течение 5 сек для тщательного перемешивания. Инкубируют в течение 15 мин при 25 °С в темноте.

Примечание: время реакции может быть увеличено до получения заметного изменения цвета.

7 Остановка реакции: по окончании инкубации добавляют по 0,05 см³ стоп-реагента в каждую лунку, осторожно перемешивают.

8 Измерение ОП: измеряют значение оптической плотности для каждой лунки при 450 нм с помощью микропланшетного фотометра. Время от внесения стоп-реагента до измерения не должно превышать 10 минут.

12 Обработка (вычисление) и оформление результатов измерений

Обработку результатов измерений выполняют путем измерения оптической плотности содержимого лунок на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Оптическая плотность каждой лунки сравнивается с нулевым стандартом, значение которого принимается за 100 %.

Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,5 ($A_{450nm} < 0,5$), то это указывает на ухудшение качества реагентов. Раствор ТМБ должен быть забракован, если он приобрел окраску до постановки реакции.

12.1 Вычисление результатов измерений

Обработка результатов без программного обеспечения

Рассчитывают средние значения оптической плотности стандартных и исследуемых образцов, полученных по 2 параллельным микролункам в результате двух параллельных определений.

Относительную оптическую плотность (A) вычисляют по формуле:

$$A = \frac{B_i}{B_0} \times 100,$$

где:

A - значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения;

B_i - среднее значение оптической плотности стандартных растворов хлорамфеникола (левомицетина);

B_0 - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

По величинам значений относительной оптической плотности (% поглощения), вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации хлорамфеникола (левомицетина) в $нг/дм^3$ строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

Концентрацию хлорамфеникола (левомицетина) (x) в $нг/дм^3$ считают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности.

Массовую концентрацию (содержание) хлорамфеникола (левомицетина) в испытуемом образце (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{F \times x}{K},$$

где:

X - массовая концентрация хлорамфеникола (левомицетина) в испытуемой пробе, $мг/кг$ ($мг/дм^3$ - для жидких продуктов);

x - массовая концентрация хлорамфеникола (левомицетина) в экстракте испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, $нг/дм^3$;

F - фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 2;

K - коэффициент пересчета $нг/дм^3$ в $мг/кг$ ($мг/дм^3$ - для жидких проб), равный 1000 000.

Обработка результатов без программного обеспечения

Рассчитывают средние значения оптической плотности стандартных и исследуемых образцов, полученных по 2 параллельным микролункам в результате двух параллельных определений.

Относительную оптическую плотность (A) вычисляют по формуле:

$$A = \frac{B_i}{B_0} \times 100,$$

где:

A — значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения;

B_i - среднее значение оптической плотности стандартных растворов хлорамфеникола (левомицетина);

B_0 - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

По величинам значений относительной оптической плотности (% поглощения), вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации хлорамфеникола (левомицетина) в нг/дм³ строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

Концентрацию хлорамфеникола (левомицетина) (x) в нг/дм³ считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности.

Массовую концентрацию (содержание) хлорамфеникола (левомицетина) в испытуемом образце (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{F \times x}{K},$$

где:

X - массовая концентрация хлорамфеникола (левомицетина) в испытуемой пробе, мг/кг (мг/дм³ - для жидких продуктов);

x - массовая концентрация хлорамфеникола (левомицетина) в экстракте испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, нг/дм³;

F - фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 2;

K - коэффициент пересчета нг/дм³ в мг/кг (мг/дм³ - для жидких проб), равный 1000 000.

Таблица 2 Факторы разбавления для расчета содержания хлорамфеникола (левомицетина) в различных пробах

Продукты животного происхождения	Фактор разведения
1	2
Ткани (рыба, креветки, печень, мясо)	0,5
Сыворотка свиньи	1
Моча свиньи	1
Мёд	0,5
Кишечная оболочка	1
Молоко цельное	0,5
Вода	2
Сухое молоко	1
Яйца	2

Корма	1
Йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, пахта и сыворотка, сливки	0,5
Творог, сметана	1
Масло сливочное	5,2
Сыр	1
Ткани (рыба, креветки, печень, мясо)	0,5
Сыворотка свиный	1
Моча свиный	1
Мёд	0,5
Кишечная оболочка	1
Молоко цельное	0,5
Вода	2
Сухое молоко	1

12.2 Оформление результатов измерений

12.2.1 Результат измерений представляют в виде:

$$(\bar{X} \pm \Delta) \text{ мг/кг при вероятности } P = 0,95,$$

где:

\bar{X} - среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ - граница абсолютной погрешности, мг/кг:

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot X,$$

где:

δ - граница относительной погрешности методики. Значения показателя точности δ приведены в таблице 1 (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, таблица 1), %.

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

- содержание хлорамфеникола (левомицетина) в молоке < 0,0000125 мг/кг >>

Численные значения результатов измерений должны оканчиваться цифрой того же разряда, что и значения характеристики погрешности, которые не должны содержать более двух значащих цифр.

12.2.2 Допустимо представлять результат в виде

$$X \pm \Delta_1 \text{ при условии } \Delta_1 < \Delta,$$

где:

$\pm \Delta_L$ – границы погрешности результатов измерений при $P=0,95$, установленные при реализации методики в лаборатории и обеспечиваемые контролем стабильности результатов измерений.

12.2.3 Результаты измерений оформляют протоколом или записью в журнале, по формам, приведенным в документах СМК лаборатории.

13 Контроль качества результатов измерений

13.1 Общие положения

13.1.1 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);
- контроль стабильности результатов измерений (среднеквадратического отклонения погрешности).

13.1.2 Для методик измерений, используемых постоянно, периодичность контроля качества результатов измерений устанавливают в зависимости от общего числа анализируемых рабочих проб за месяц.

13.2 Оценка показателя повторяемости методики анализа

13.2.1 Оперативный контроль повторяемости проводят с использованием рабочих проб при проведении параллельных определений для получения результата испытаний (измерений), как среднего значения.

13.2.2 Оперативный контроль повторяемости проводят путем сравнения расхождения «п» результатов параллельных определений, полученных при испытании (измерении) пробы с нормативом повторяемости.

Повторяемость результатов параллельных определений признают удовлетворительной, если:

$$r_k = X_{\max} - X_{\min} \leq r,$$

где:

r – норматив повторяемости, указанный в МИ.

Если норматив не указан, то он рассчитывается по формуле:

$$r = Q(P, n) * \sigma_r,$$

где:

σ_r – показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторяемости, соответствующая содержанию компонента в пробе).

$$Q(P, n) = 2,77 \quad \text{при } n=2, P=0,95;$$

$$Q(P, n) = 3,31 \quad \text{при } n=3, P=0,95;$$

$$Q(P, n) = 3,63 \quad \text{при } n=4, P=0,95;$$

$$Q(P, n) = 3,86 \quad \text{при } n=5, P=0,95.$$

Если $t_k \leq t$, то повторяемость результатов параллельных определений признают удовлетворительной.

При невыполнении условия эксперимент повторяют. При повторном невыполнении условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

Значение предела повторяемости приведены в таблице №3

Таблица 3-Диапазон измерений, значения пределов повторяемости при доверительной вероятности $P=0,95$

Продукты животного происхождения	Диапазон измерений массовой концентрации хлорамфеникола в определяемых продуктах, мг/кг	Предел повторяемости (относительное значение допустимого расхождения между двумя параллельными результатами измерений), г, %
Рыба	0,0000125 – 0,00101	5
Креветки	0,0000125 – 0,00101	5
Печень, мясо	0,0000125 – 0,00101	6
Мясо	0,0000125 – 0,00101	10
Яйца	0,00005 - - 0,00405	8
Сыр	0,000025 – 0,00203	9
Масло сливочное	0,00013 - - 0,01056	9
Мед	0,0000125 – 0,00101	12
Молоко	0,0000125 – 0,00101	9
Сухое молоко	0,000025 – 0,00203	9
Сливки	0,0000125 – 0,00101	9
Кефир	0,0000125 – 0,00101	8
Йогурт	0,0000125 – 0,00101	9
Пахта и сыворотка	0,0000125 – 0,00101	8
Сметана	0,000025 – 0,00203	10
Творог	0,000025 – 0,00203	10
Моча (свины)	0,000025 – 0,00203	13
Сыворотка (свины)	0,000025 – 0,00203	9
Кишечная оболочка	0,000025 – 0,00203	9
Корма	0,000025 – 0,00203	12
Вода	0,00005 - - 0,00405	6

14 Проверка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости

14.1 Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости R. При выполнении этого условия приемлемы

оба результата измерений и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение.

Значение предела воспроизводимости приведены в таблице №4

Таблица 4-Диапазон измерений, значения пределов воспроизводимости при доверительной вероятности P=0,95

Продукты животного происхождения	Диапазон измерений массовой концентрации хлорамфеникола в определяемых продуктах, мг/кг	Предел воспроизводимости (допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений, полученных в разных лабораториях при P=0,98), R, %
Рыба	0,0000125 – 0,00101	4
Креветки	0,0000125 – 0,00101	4
Печень, мясо	0,0000125 – 0,00101	5
Мясо	0,0000125 – 0,00101	7
Яйца	0,00005 - - 0,00405	2
Сыр	0,000025 – 0,00203	3
Масло сливочное	0,00013 - - 0,01056	3
Мед	0,0000125 – 0,00101	5
Молоко	0,0000125 – 0,00101	4
Сухое молоко	0,000025 – 0,00203	4
Сливки	0,0000125 – 0,00101	7
Кефир	0,0000125 – 0,00101	5
Йогурт	0,0000125 – 0,00101	5
Пахта и сыворотка	0,0000125 – 0,00101	4
Сметана	0,000025 – 0,00203	7
Творог	0,000025 – 0,00203	8
Моча (свиньи)	0,000025 – 0,00203	5
Сыворотка (свиньи)	0,000025 – 0,00203	6
Кишечная оболочка	0,000025 – 0,00203	1
Корма	0,000025 – 0,00203	1
Вода	0,00005 - - 0,00405	2

14.2 При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно ГОСТ Р ИСО 5725 - 6 (раздел 5) или МИ 2881.

Примечание – Периодичность оперативного контроля процедуры измерений, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируют во внутренних документах лаборатории.

Проверка приемлемости проводится при необходимости сравнения результатов измерений, полученных двумя лабораториями

Ключевые слова: методика измерений, метод иммуоферментного анализа, тест-системы производства «Иммунотэкс», массовая концентрация хлорамфеникола, продукция животного происхождения.

Руководитель разработки и исполнитель:

Начальник научного отдела
ООО НПО «Иммунотэкс»,
кандидат биологических наук, доцент

А.А. Филь

Утверждена:

Первым заместителем генерального директора
ФБУ «Ростовский ЦСМ»



В.А. Романов

Свидетельство об аттестации
методики измерений

№ 029-01-00281-2013-2019
от 25.09.2020 г.

Руководитель
предприятия-разработчика:
Директор ООО НПО «Иммунотэкс»



М.В. Батурин

МП