СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке
БелГИМ

_____ А. Коломиец

«03» 06 2013 г.

УТВЕРЖДАЮ

Управляющий
ООО «КомПродСервис»

_____ Д.Ч. Кучинский

«___» _____ 2013 г.

Определение содержания бацитрацина в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием тест-систем производства EuroProxima B.V., Нидерланды

Методика выполнения измерений

МВИ.МН 4652-2013

МВИ аттестована
РУП "Белорусский государственный институт метрологии"
Свидетельство об аттестации
№ 779/2013
от "03" 06 2013 г.

МИНСК 2013

КОПИЯ ВЕРНА

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения **3**
2 Точность измерений **3**
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы **4**
3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы 4
3.2 Реактивы 5
4 Метод измерений **5**
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов **6**
5.1 Общие требования безопасности 6
5.2 Требования безопасности при работе с метанолом 6
5.3 Требования к квалификации операторов 6
6 Условия выполнения измерений **6**
7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении **6**
8 Условия хранения тест-систем **7**
9 Подготовка к выполнению измерений **7**
9.1 Отбор образцов 7
9.2 Подготовка лабораторной посуды 7
9.3 Приготовление растворов 7
9.4 Подготовка проб 8
9.5 Подготовка тест-систем 8
9.6 Приготовление раствора коньюгата 10
10 Выполнение измерений **10**
11 Обработка результатов измерений **11**
12 Контроль бланка **13**
13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости **13**
14 Оформление результатов измерений **14**
14.1 Форма представления результата измерения с использованием расширенной неопределенности 14
14.2 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием предела измерения 14
14.3 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием значения верхней границы диапазона измерений 14
15 Контроль точности результатов измерений **14**
15.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости. 15
15.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности 15
15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 15
15.4 Контроль правильности 16
15.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 17
16 Нормативные ссылки **19**
Библиография **20**

КОПИЯ ВЕРНА
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

1 Область применения

Настоящая методика распространяется на мясо (мышцы), колбасные изделия, яйца и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания бацитрацина.

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации бацитрацина с использованием тест-систем BACITRACIN ELISA производства EuroProxima B.V., Нидерланды.

Диапазон измерений методики составляет от 9,4 мкг/кг до 300,0 мкг/кг.

Предел измерения для данной методики составляет 9,4 мкг/кг.

2 Точность измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой концентрации бацитрацина в указанном выше диапазоне с показателями прецизионности, указанными в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
Мясо, колбасные изделия	от 9,4 до 300,0 включ.	4,6	6,4
Яйца	от 9,4 до 300,0 включ.	3,5	7,5

В результате оценки показателя правильности для данной методики была установлена незначимость смещения во всем диапазоне измерений.

Значения оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблице 2.

Указанные в таблицах 1, 2 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента, проведенного в соответствии с:

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

Таблица 2 – Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K=2, P=95$ %
Мясо, колбасные изделия	от 9,4 до 300,0 включ.	9	18
Яйца	от 9,4 до 300,0 включ.	10	20

КОПИЯ ВЕРНА
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы

3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 500 г, ценой деления не более 0,01 г.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 220 г, ценой деления не более 0,0001 г.

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %).

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

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 2000 g (пробирки вместимостью 15 $см^3$).

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 20 °С в морозильной камере.

Лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, имеющий в комплекте вставку для микротитровальных планшетов.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий скорость вращения до 60 об/мин.

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

Дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников:

- с диапазоном объемов дозирования от 10 $мм^3$ до 100 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 2,0 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 $мм^3$ до 1000 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 $см^3$ до 5 $см^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,0 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 2 $см^3$ до 10 $см^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,0 %;
- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 50 $мм^3$ до 350 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более ± 4,6 % (при отсутствии автоматического устройства для отмывки иммунологических планшетов).

Пленка «парафильм» или скотч.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Штатив для пробирок.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$.

Пробирки стеклянные вместимостью 5 $см^3$ типа П–1–5–0,1 ХС по ГОСТ 1770 или пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 1,5 $см^3$.

Колбы конические вместимостью 100 $см^3$, 500 $см^3$ типа Кн-1-100–29/32 ТС, Кн–1–500–29/32 ТС 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 1-2-1, 1-2-5, 1-2-10 по ГОСТ 29169.

Палочки стеклянные оплавленные.

КОПИЯ ВЕРНА
Отдел научно-технической информации нормативной документации

Цилиндры мерные вместимостью 25 $см^3$, 50 $см^3$, 100 $см^3$ типа 3–25–2, 3–50–2, 3–100–2 по ГОСТ 1770.

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

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью не более ± 1 °С;
- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету от 100 $мм^3$ до 350 $мм^3$;

3.2 Реактивы

Метанол ч.д.а по ГОСТ 6995.

Вода деионизированная (бидистиллированная) или дистиллированная по ГОСТ 6709.

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Бацитрацина цинковая соль с массовой долей основного вещества не менее 90 %.

Тест-системы BACITRACIN ELISA производства EuroProxima B.V., Нидерланды, каталожный номер 5151BAC, в составе (таблица 3).

Таблица 3 – Состав тест-системы BACITRACIN ELISA

Компонент тест-систем	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых специфичными антителами)	1 шт
Нулевой градуировочный раствор (с концентрацией 0 $нг/см^3$)	1 шт. × 2 $см^3$
Градуировочные растворы 1 – 6 с концентрацией 0,625; 1,250; 2,500; 5,000; 10,000; 20,000 $нг/см^3$	6 шт. × 1 $см^3$
100×концентрат конъюгата	1 шт. × 100 $мм^3$
Раствор субстрата (готовый к применению)	1 шт. × 12 $см^3$
Стоп-реагент (готовый к применению)	1 шт. × 15 $см^3$
Буфер для разбавления	1 шт. × 15 $см^3$
Буфер для разбавления образцов	1 шт. × 40 $см^3$
20×концентрат моющего буфера	1 шт. × 30 $см^3$

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

4 Метод измерений

В лунки микротитровального планшета, сенсибилизированные специфичными антителами к бацитрацину, добавляются градуировочные растворы или растворы проб вместе с коньюгатом, представляющим собой бацитрацин, маркированный пероксидазой хрена. Бацитрацин, маркированный пероксидазой хрена и бацитрацин, присутствующий в градуировочных растворах и растворах проб, конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА). После 60-минутной инкубации несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки.

После добавления раствора субстрата/хромогена (тетраметилбензидин)

КОПИЯ ВЕРНА

связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт.

Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Измеренная оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации бацитрацина в пробе. Массовая концентрация бацитрацина в пробе определяется с использованием градуировочной зависимости, построенной по 7 градуировочным растворам.

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

При выполнении работ по определению массовой концентрации бацитрацина обслуживающий персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

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

5.2 Требования безопасности при работе с метанолом

Персонал, работающий с метанолом и его растворами, должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования инструкции по технике безопасности при работе с метанолом, утвержденной в установленном порядке.

Все работы с метанолом и его растворами должны проводиться строго в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты (фартуки, перчатки, очки). Запрещается работать с метанолом при выключенной приточно-вытяжной вентиляции и без применения средств индивидуальной защиты.

5.3 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 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 ^{0}С.

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

КОПИЯ ВЕРНА

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце.
- в особых случаях, которые оговорены по тексту методики, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например в ящик стола.

8 Условия хранения тест-систем

Хранение тест-систем осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Не допускается замораживание реагентов с целью увеличения их срока хранения.

Хранение неиспользованных стрипов (лунок) осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в плотно закрытом оригинальном пакете.

Необходимо исключить прямое попадание света на раствор субстрата.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб по п. 9.4 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

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

Запрещается:

- многократное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование бытовых моющих средств для мойки лабораторной посуды.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление смеси метанол – буфер для разбавления образцов (80 % метанола)

В пробирку для центрифугирования вместимостью 15 см^3 или коническую колбу вместимостью 100 см^3 (в зависимости от приготовляемого объема) приливают аликвоту буфера для разбавления образцов объемом V_B, см^3, отмеренные дозатором или пипеткой, затем приливают в 4 раза большую по объему аликвоту метанола, отмеренную цилиндром и перемешивают.

Требуемый объем аликвоты буфера для разбавления образцов, см

КОПИЯ ВЕРНА

определяют, исходя из количества анализируемых образцов N_{Smp}, по следующей формуле

$$V_B = \frac{4 \cdot N_{Smp} + V_1}{5}, \quad (1)$$

где V_1 – объем смеси, приготавливаемой в запас, $см^3$ (не менее 5 % от приготавливаемого объема).

Раствор используют свежеприготовленным.

9.4 Подготовка проб

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Образцы гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 2 $см^3$ смеси метанол-буфер для разбавления образцов, приготовленной по п. 9.3.1. Содержимое пробирок перемешивают путем переворачивания вверх-вниз на ротаторе в течение 15 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 2000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором аликвоты надосадочной жидкости объемом 50 $мм^3$, и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф. В пробирки с аликвотами надосадочной жидкостью добавляют отмеренные дозатором 200 $мм^3$ буфера для разбавления образцов и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С не более одного часа.

9.5 Подготовка тест-систем

9.5.1 Предварительная подготовка и правила обращения с тест-системами

Тест-систему извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С от 0,5 до 1 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

Растворы из тест-системы следует готовить непосредственно перед проведением ИФА. Перед использованием реагенты необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов.

Особенное внимание следует обратить на раствор субстрата, в котором при температуре 4 °С выпадает осадок. Перед применением раствор субстрата, предварительно нагретый до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С, необходимо аккуратно перемешать до растворения осадка.

Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-систем других фирм не

допускается.

Не допускается использование реагентов, имеющих следующие признаки распада:

- голубая окраска раствора хромогена до внесения его в лунки;
- оптическая плотность нулевого градуировочного раствора (концентрация 0 нг/см^3) меньше 0,8.

9.5.2 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 16 + 2N_{SMP}, \quad (2)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

16 – количество лунок для градуировочных растворов и бланка.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленными в соответствии с п. 9.5.1, 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.

Размечают положения лунок, предназначенные для бланка, градуировочных растворов и растворов проб, согласно рисунку 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Б	Б	П-1	П-1	П-9	П-9						
B	С-0	С-0	П-2	П-2	П-10	П-10						
C	С-1	С-1	П-3	П-3	П-11	П-11						
D	С-2	С-2	П-4	П-4	П-12	П-12						
E	С-3	С-3	П-5	П-5	П-13	П-13						
F	С-4	С-4	П-6	П-6	П-14	П-14						
J	С-5	С-5	П-7	П-7	П-15	П-15						
G	С-6	С-6	П-8	П-8	П-16	П-16						

Рисунок 1 - Схема расположения лунок для бланка, градуировочных растворов и растворов проб

где Б – бланк,

С-0, *С*-1, … *С*-6 – градуировочные растворы, включая нулевой,

П-1, *П*-2, … *П*-16 - исследуемые пробы,

1,2,3….12 - номера стрипов в планшете,

A, B, … G - обозначения лунок в стрипах.

Не рекомендуется одновременно использовать более 6-ти стрипов. При необходимости исследовать большее количество проб анализ выполняется в несколько этапов.

9.5.3 Приготовление моющего буфера

В коническую колбу вместимостью 500 см^3 вносят дозатором аликвоту 20×концентрата моющего буфера, подготовленного по п. 9.5.1, и доводят цилиндром в 19 раз больший объем деионизированной воды, после чего содержимое

КОПИЯ ВЕРНА

колбы перемешивают. Требуемый объем аликвоты 20×концентрата моющего буфера V_K, см^3, определяют, исходя из планируемого к использованию количества стрипов N_{STR}, по формуле:

$$V_K = 2 \cdot N_{STR} \quad (3)$$

Полученный раствор используют свежеприготовленным.

9.6 Приготовление раствора коньюгата

Раствор готовится непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

100×концентрат коньюгата, подготовленный по п. 9.5.1, центрифугируют в следующем режиме: от 20 °С до 25 °С, 1000 g, 1 мин. Отбирают дозатором аликвоту 100×концентрата коньюгата и переносят в пробирку вместимостью 5 см^3 или в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф. В пробирку добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления из расчета 990 мм^3 на 10 мм^3 100×концентрата коньюгата (99:1) и перемешивают на вортексе. 100×концентрат коньюгата сразу же убирают в холодильник и хранят в соответствии с п. 8.

Требуемый объем аликвоты 100×концентрата коньюгата V, мм^3, определяют, исходя из планируемого к использованию количества лунок N_W, по следующей формуле

$$V = \frac{50 \cdot (N_W - 2) + V_1}{100}, \quad (4)$$

где V_1 – объем раствора коньюгата, приготавливаемого в запас, мм^3 (не менее 50 мм^3).

Если согласно п. 10.1 бланк в лунки микротитровального планшета не вносят, то расчет по формуле (4) производят, увеличивая количество лунок N_W на 2.

10 Выполнение измерений

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.4. Компоненты тест-систем подготавливают в соответствии с п. 9.5.

10.1 В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.5.2, вносят отобранные дозатором:

- в лунки А1, А2 – две аликвоты объемом 100 мм^3 буфера для разбавления проб (бланка);
- в лунки В1 – G2 – по две аликвоты объемом 50 мм^3 каждого градуировочного раствора, включая нулевой;
- в лунки А3 – G6 – аликвоты объемом 50 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение градуировочных растворов производится в порядке возрастания их концентраций.

Примечание: при выполнении измерений согласно п. 10.11 с использованием автоматического микропланшетного фотометра с референсным фильтром на 630 нм (620 нм), бланк в лунки микротитровального планшета не вносят. Освободившиеся лунки используют для градуировочных растворов или растворов проб.

10.2 В каждую лунку микротитровального планшета, **за исключением лунок А1, А2,** вносят отобранный дозатором раствор коньюгата, приготовленный по п. 9.6.

объемом 50 мм^3.

10.3 Аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают содержимое. Встряхивания, постукивания планшетом по столу не допустимы.

10.4 Закрывают планшет пленкой «парафильм» или заклеивают скотчем.

10.5 Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 60 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 60 мин при условиях, указанных в разделе 7.

10.6 По окончании инкубации жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета.

10.7 Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 300 мм^3 моющего буфера, приготовленного по п. 9.5.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

Примечание: В процессе работы следует избегать высыхания лунок в перерывах между отдельными этапами работы и увеличения длительности перерывов. Точность результатов измерений зависит от равномерного промывания лунок, поэтому следует точно соблюдать процесс промывки. Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для промывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – 3, объем используемого промывочного раствора – 300 мм^3.

10.8 В каждую лунку вносят дозатором по 100 мм^3 раствора субстрата и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают его содержимое.

10.9 Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. Отсчет времени инкубации начинают немедленно после окончания внесения раствора субстрата. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в защищенном от света месте, при условиях, указанных в разделе 7.

10.10 Сразу же после окончания инкубации в каждую лунку планшета дозатором вносят по 100 мм^3 раствора стоп-реагента и аккуратными круговыми движениями перемешивают его содержимое.

10.11 Немедленно после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке планшета на автоматическом микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

При наличии автоматического микропланшетного фотометра, позволяющего выполнять измерения с референсным фильтром на 630 нм (620 нм) измерения производят с использованием референсного фильтра. Использование данного режима измерений возможно при положительном результате контроля бланка согласно п. 12.

11 Обработка результатов измерений

Обработка результатов измерений производится с помощью программного обеспечения «Simplerfits» версии не ниже 2.3, разработанного EuroProxima B.V. Нидерланды, далее «программное обеспечение».

Программным обеспечением строится градуировочная зависимость

КОПИЯ ВЕРНА

$\lg\left[B'/(B_0 - B)\right]$ от десятичного логарифма концентрации вида

$$\lg\left[B'/(B_0 - B)\right] = a + b \cdot \lg C, \quad (5)$$

где B_0 – оптическая плотность нулевого градуировочного раствора (концентрация 0 нг/см^3);

C – концентрация бацитрацина в растворе, нг/см^3;

B' – скорректированная оптическая плотность раствора, рассчитывается по формуле

$$B' = B - B_{BL}, \quad (6)$$

где B_{BL} – оптическая плотность бланка, рассчитываемая по формуле

$$B_{BL} = \frac{B_{BL1} + B_{BL2}}{2}, \quad (7)$$

где B_{BL1}, B_{BL2} – оптические плотности, измеренные в лунках А1 и А2 (бланк);

При измерении оптической плотности с референсным фильтром измерения бланка не производят и при расчетах принимают, что $B' = B$ при условии получения положительного результата контроля бланка в соответствии с п. 12.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a,b производится программным обеспечением с помощью МНК на основании пар значений $\lg\left[B'_i/(B_0 - B_i)\right]$, $\lg C_i$ полученных для шести градуировочных растворов, где ($i = 1..6$), C_i – концентрация i –го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям двух измерений оптической плотности, B' – скорректированное по формуле (6) среднее значение двух измерений оптической плотности.

Содержание бацитрацина в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot 10^{\frac{\lg(B'_x/(B_0 - B_x)) - a}{b}}, \quad (8)$$

где X – концентрация бацитрацина в пробе, мкг/кг;

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

B'_x – скорректированная по формуле (6) оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, равный 15.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 13

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

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

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ}, равный 9,40 мкг/кг, то дается односторонняя оценка

КОПИЯ ВЕРНА

концентрации бацитрацина в образце с использованием предела измерения согласно п. 14.2.

Если окончательный результат измерений $\overline{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, равное 300,0 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации бацитрацина в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 14.3.

Примечание: допускается использовать для обработки результатов измерений программное обеспечение "RIDA®Soft", версии 7.01 и выше, разработанное R-Biopharm AG (Германия) с применением файлов методов (EP BAC.MET), предоставленных официальным представителем компаний EuroProxima B.V., R-Biopharm AG в Республике Беларусь – ОДО «КомПродСервис».

12 Контроль бланка

Данная процедура проводится, если при выполнении измерений в соответствии с п. 10 бланк в лунки микротитровального планшета согласно п. 10.1 не вносят, и оптическая плотность по п. 10.11 измеряется с использованием референсного фильтра.

При выполнении процедуры контроля бланка производится измерение оптической плотности бланка согласно п. 10 с использованием референсного фильтра. Если рассчитанное по формуле (7) значение B_{BL} удовлетворяет следующему условию

$$B_{BL} \le 0{,}010, \qquad (10)$$

то результат контроля бланка признается положительным, в противном случае – отрицательным.

Процедура выполняется однократно для каждой новой партии тест-систем в ходе выполнения серии измерений проб.

13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6-2002 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

$$|X_1 - X_2| \le r_{abs}, \qquad (11)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\overline{X}$, рассчитанное по формуле (9).

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

$$r_{abs} = 0{,}01 \cdot r \cdot \overline{X}, \qquad (12)$$

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

r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 4.

При невыполнении условия (11) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

КОПИЯ ВЕРНА

14 Оформление результатов измерений

14.1 Форма представления результата измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$\left(\overline{X} \pm U(X)\right), \text{ мкг/кг}$$

при доверительной вероятности P = 0,95, K=2

где $\overline{X}$ – результат измерений, 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

$$U(X) = 0{,}01 \cdot U \cdot \overline{X}, \qquad (13)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с МВИ, %, приведенная в таблице 2.

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

14.2 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием предела измерения

Если конечный результат измерений $\overline{X}$ оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ} , равный 9,40 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации бацитрацина в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

$$\textit{менее } X_{LQ},$$

где X_{LQ} – значение предела измерений, приведенное выше.

14.3 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если конечный результат измерений $\overline{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , равное 300,0 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации бацитрацина в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

$$\text{более } X_{HL},$$

где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений, приведенное выше.

15 Контроль точности результатов измерений

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 (замена реактивов,

КОПИЯ ВЕРНА

новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.);

- при любых выявленных несоответствиях в работе лаборатории, применительно к методике выполнения измерений.

15.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации бацитрацина при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 13.

15.2 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 5725-6-2002 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\overline{X_1}, \overline{X_2}$ согласно разделу 10, варьируя факторы промежуточной прецизионности оператор, время и обеспечивая контроль повторяемости по п. 12. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\overline{X_1}, \overline{X_2}$

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X_1} + \overline{X_2}}{2}, \tag{14}$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$\left|\overline{X_1} - \overline{X_2}\right| \le \mathrm{CD}_{\text{абс}}, \tag{15}$$

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

$$CD_{абс} = 0{,}01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \tag{16}$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 4, %.

15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6-2002 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 12.

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

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \tag{17}$$

КОПИЯ ВЕРНА

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

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

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

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

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

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

k – коэффициент, равный 1,3;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 4.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 5 СТБ ИСО 5725-6-2002.

Таблица 4 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн.}$, %
Мясо, колбасные изделия	13	15	14
Яйца	10	20	18

15.4 Контроль правильности

Контроль правильности определения массовой концентрации бацитрацина производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением концентрации вещества (рабочая проба с добавкой).

Неопределенность аттестованного значения массовой концентрации бацитрацина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

15.4.1 ОК, представляющим собой рабочие пробы с добавкой

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая концентрация бацитрацина в которой менее предела измерения данной МВИ, в которую внесена добавка. Добавка вносится в виде растворов бацитрацина непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации бацитрацина X_{am} в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

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

КОПИЯ ВЕРНА
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

где C_{ST} – концентрация бацитрацина в растворе, нг/см^3;

V_{ST} – объем добавляемого раствора, см^3;

m – масса навески пробы, г.

Величина массовой концентрации бацитрацина в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из бацитрацина цинковой соли в соответствии с рекомендациями производителя. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы). Относительная стандартная неопределенность концентрации бацитрацина в растворах для добавки не должна превышать 3 %.

15.4.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой концентрации бацитрацина $\overline{X_K}$ в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (17) при выполнении условия повторяемости по п. 12.

Критерием приемлемости является условие

$$\left|\overline{X_K} - X_{am}\right| \le 0{,}01 \cdot K_{отн} \cdot X_{am}, \qquad (21)$$

где $K_{отн.}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 4.

X_{am} – установленное значение массовой концентрации бацитрацина в ОК, мкг/кг.

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

15.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)

С помощью КК контролируют следующие показатели точности:

- повторяемость (R-карта или карта размахов);
- наличие смещения или правильность (Recovery-карта).

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [3] и СТБ ИСО 5725-6-2002, раздел 6.

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости в соответствии с таблицей 1.

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.

КОПИЯ ВЕРНА

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 стандартного раствора. Предварительно установленная массовая концентрация бацитрацина в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку бацитрацина в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

15.5.1 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

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1{,}128 \cdot \sigma_r, \tag{22}$$

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2{,}834 \cdot \sigma_r \tag{23}$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3{,}686 \cdot \sigma_r \tag{24}$$

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

Ведение КК предусматривает набор данных X_1, X_2 при выполнении испытаний ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчета фактических относительных значений размаха W по формуле (25), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \tag{25}$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [3], п. 7.

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формулам (25), (26)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^{N} W_i \Big/ N}{d_2}, \tag{26}$$

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.

КОПИЯ ВЕРНА
Белорусский государственный институт метрологии
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

15.5.2 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

$$\overline{\mathrm{Re}c} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Re}c_i}{N}, \qquad (27)$$

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

$\mathrm{Re}c_i$ – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i–го измерения пробы с добавкой бацитрацина, по формуле

$$\mathrm{Re}c_i = \frac{X_i}{X_{\mathrm{exp}}} \cdot 100, \qquad (28)$$

где X_i – массовая концентрация бацитрацина в пробе с добавкой, полученное для i–го измерения, мкг/кг;

X_{exp} – рассчитанное значение массовой концентрации бацитрацина в пробе с добавкой, мкг/кг.

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 2 \cdot S_{REC}, \qquad (29)$$

- Границы регулирования

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 3 \cdot S_{REC} \qquad (30)$$

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

$$S_{REC} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left(\overline{\mathrm{Re}c} - \mathrm{Re}c_i\right)^2}{N-1} \qquad (31)$$

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

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений X_i при выполнении испытаний ОК в соответствии с МВИ, расчета фактических значений коэффициента извлечения $\mathrm{Re}c_i$ по формуле (28), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [3], п. 7.

16 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

ГОСТ 8.010–99	Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности

КОПИЯ ВЕРНА

СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6995-77	Реактивы. Метанол-яд. Технические условия
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026–76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 24104–2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29169–91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой
ГОСТ 29227–91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
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 5725–4–2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4 Основные методы определения правильности стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725–6–2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике

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]	ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения
[3]	ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта

КОПИЯ ВЕРНА

gost.e-ecolog.ru