СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке БелГИМ

_____ Т.А. Коломиец

_____ 2014 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Компания Альгимед»

_____ В.В. Лютынский

«__» _____ 2014 г.

Методика выполнения измерений содержания стрептомицина в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием набора реагентов MaxSignal® производства BIOO Scientific Corporation (США)

МВИ.МН 4894-2014

Республиканское унитарное предприятие «Белорусский государственный институт метрологии (БелГИМ)»
Свидетельство № 835/2014
об аттестации МВИ от 28.04.20 14 **г.**

МИНСК 2014

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения 3
2 Точность измерений 3
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы 3
4 Метод измерений 6
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов 6
5.1 Общие требования безопасности 6
5.2 Требования к квалификации операторов 6
6 Условия выполнения измерений 6
7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении 6
8 Условия хранения набора реагентов 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 набора реагентов 8
9.5 Подготовка проб 10
10 Выполнение измерений 12
10.1 Общие требования 12
10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа 13
11 Обработка результатов измерения 14
11.1 Расчет массовой концентрации 14
11.2 Определение массовой концентрации стрептомицина при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки 15
11.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости 16
12 Оформление результатов измерений 16
12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности 16
12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации стрептомицина с использованием предела измерения 16
12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации стрептомицина с использованием значения верхней границы диапазона измерений 17
13 Контроль точности результатов измерений 17
13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости 17
13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности 17
13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 18
13.4 Контроль правильности 19
13.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 20
14 Нормативные ссылки 22
Библиография 23

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед для документов г. Минск

Российский государственный институт метрологии Отдел научно технической информации и нормативной документации

1 Область применения

Настоящая методика распространяется на молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое[1], масло сливочное, сыр, творог, молочную сыворотку, восстановленную сухую молочную сыворотку, йогурт, кефир, сметану и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания стрептомицина.

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации стрептомицина с использованием набора реагентов «MaxSignal ® для определения стрептомицина», каталожный номер 1014-01B («MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit», Reference # 1014-01B) производства BIOO Scientific Corporation (США), далее набор реагентов.

Диапазон измерений методики составляет от 5,0 до 250,0 мкг/кг. Предел измерения данной методики составляет 5,0 мкг/кг.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Точность измерений

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

В таблице 1 также приведены значения оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности, рассчитанные с учетом обнаруживаемого смещения.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(IO)}$, %	*Относительная* суммарная стандартная неопределенность u_c, %	*Относительная* расширенная неопределенность U, %, $K = 2, P = 95$ %
от 5,0 до 250,0 включ.	3,4	8,5	11	22

Значения оценок неопределенности.

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

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

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

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г, ценой деления 0,0001 г.

[1] Результат измерений массовой концентрации стрептомицина в сухом молоке относится к восстановленному согласно данной методике продукту

Компания Альгимед для документов г. Минск
Отдел научно-технической и нормативной документации

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %), например iMark Microplate Absorbance Reader, производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США.4

Программное обеспечение «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанное BIOO Scientific Corporation (США).

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

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (пробирки вместимостью 15 $см^3$), например 1236, производства LaboGene Aps, Дания.

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

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

Лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин.

Гомогенизатор лабораторный типа TissueRuptor производства QIAGEN Group (Германия) или бытовой блендер.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от 50 °С до 55 °С.

Дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников, например Acura manual 825, Acura manual 835, Acura manual 855 производства Socorex ISBA S.A., Швейцария:

- с диапазоном объемов дозирования от 10 до 100 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 2,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 $см^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 2,0 %;
- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %.

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

- Инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью ± 1 °С, например PST-60HL производства BioSan Ltd, Латвия.
- *Устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое* с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету от 100 $мм^3$ до 350 $мм^3$, например ELx 50/8, производства BioTek Instruments, Inc., США.

Пленка «парафильм» или скотч.

Микрофибровые салфетки для очистки оптических поверхностей.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Шпатели пластиковые.

Штатив для пробирок.

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

Пробирки для центрифугирования с крышкой типа Эппендорф из полипропилена вместимостью 2 $см^3$ или аналоги.

Пробирки стеклянные вместимостью 5 $см^3$ типа П-1-5-0,1 ХС-10 см типа

КОМПАНИЯ ЭЛИТ г.МИНСК
ПАПА ДОКУМЕНТОВ
Отдел научно-технической информации и нормативной документации
4

П-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770.

Колбы конические вместимостью 100 $см^3$, 250 $см^3$ типа Кн–2–100–14/23 ХС, Кн–2–250–14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные вместимостью 50 $см^3$ 2-50-2 по ГОСТ 1770.

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

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

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

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Твин-20, производства SIGMA, каталожный номер P9416.

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Набор реагентов «MaxSignal ® для определения стрептомицина», каталожный номер 1014-01B («MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit», Reference # 1014-01B) производства BIOO Scientific Corporation (США) – набор реактивов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению концентрации стрептомицина методом иммуноферментного анализа в составе (таблица 2).

Таблица 2 – Состав набора реагентов

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых стрептомицином)	1 шт
Градуировочные растворы стрептомицина с концентрацией 0 нг/$см^3$, 0,5 нг/$см^3$, 1,0 нг/$см^3$, 2,50 нг/$см^3$, 5,0 нг/$см^3$, 10,0 нг/$см^3$	6 ×0,8 $см^3$
Антитела к стрептомицину №1	12 $см^3$
HRP-конъюгат антител № 2 (100× концентрат)	0,25 $см^3$
Растворитель для антител № 2	20 $см^3$
Экстракционный буфер для образцов (200× концентрат)	25 $см^3$
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 $см^3$
Стоп-реагент	14 $см^3$
ТМБ субстрат	12 $см^3$
Буфер для доведения проб	0,5 $см^3$
PBS буфер(10× концентрат)	25 $см^3$
Реагент для очистки	12 $см^3$
Буфер для доведения проб № 1 (1X Balance Buffer)	28 $см^3$

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера в наборах реагентов производства BIOO Scientific Corporation:

- растворитель для антител № 2;
- концентрат экстракционного буфера для образцов;
- промывочный раствор;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат;
- Буфер для доведения проб;
- Концентрат PBS буфера.





4 Метод измерений

Используемый метод основан на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого стрептомицином, вместе с пробой или градуировочным раствором добавляют первичные антитела, специфичные к стрептомицину. Присутствующий в пробе стрептомицин конкурируют со стрептомицином, нанесенным на стенки лунок, за связывание с первичными антителами. После внесения вторичных антител, коньюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с первичными антителами, связанными со стрептомицином на стенках лунки. После добавления субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность раствора при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации стрептомицина в градуировочном растворе и стрептомицина в растворе пробы. Массовая концентрация стрептомицина в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

При выполнении работ в соответствии с данной методикой 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 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;
- температура при приготовлении растворов (20 ± 2) ^{0}С;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °С.

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 ^{0}С до плюс

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альгимед г. Минск для документов
Белорусский государственный институт мет. Отдел научно-технической информации и нормативной документации

25 ^{0}C;

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

8 Условия хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Микротитровальные планшеты должны храниться в плотно закрытой упаковке. Дополнительные рекомендации по хранению набора реагентов приведены в инструкции производителя.

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 18 °С в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб по п. 9.5 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °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 PBS–буфера

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 или 250 см^3 (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10× концентрата PBS–буфера, добавляют цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты 7 см^3 концентрата PBS–буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альгимед г. Минск для документов
Государственный институт Отдел научно-информации и нормативной документации 7

$$V = \frac{6N_1 + V_1}{10}, \quad (1)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны;

V_1 – объем PBS–буфера, приготавливаемого в запас, см^3 (не менее 1 см^3).

PBS–буфер приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.2 Приготовление 10 % раствора твин-20

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 дозатором помещают навеску твин-20 массой 5,00 г, взвешенную с точностью до 0,01 г, навеску растворяют в 20 – 25 см^3 дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

10 % раствор твин-20 хранят защищенным от действия света в плотно закрытой стеклянной посуде не более 3 месяцев.

Допускается использовать готовый 10 % раствор твин-20, который хранят в соответствии с инструкцией производителя.

9.3.3 Приготовление PBS–буфера с твином

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 или 250 см^3 (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или цилиндром аликвоту 10× концентрата PBS–буфера, добавляют цилиндром в 8,9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают. Затем в колбу добавляют дозатором 10 % раствор твин-20, приготовленный по п. 9.3.2, объемом в десять раз меньшим по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата, и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата PBS–буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{0{,}8N_2 + 8N_3 + V_1}{10}, \quad (2)$$

где N_2 – количество анализируемых образцов молока;

N_3 – количество анализируемых образцов масла, сыра, творога;

V_1 – объем PBS–буфера с твином, приготавливаемого в запас, см^3 (не менее 1 см^3).

PBS–буфер с твином приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.4 Подготовка набора реагентов

9.4.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

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

Компания Альгимед
г. Минск
для документов
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

При работе необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты набора реагентов.

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

9.4.2 Подготовка микротитровального планшета

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

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

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с п. 9.4.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w. Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 8.

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

Не рекомендуется одновременно использовать более шести стрипов. Если необходимо провести измерение более 18 образцов, ИФА выполняется несколько раз.

9.4.3 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 $см^3$ приливают в коническую колбу вместимостью 250 $см^3$ и добавляют отмеренную цилиндром вместимостью 25 $см^3$ или 100 $см^3$ (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 19 раз больше, чем объем концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 $см^3$, то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 $см^3$. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 6-ти недель в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.4.4 Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2

В стеклянную пробирку вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 объемом не менее 20 $мм^3$, добавляют дозатором в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для антител № 2. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения закрытой пробирки.

КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ г. МИНСК
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле

$$V = \frac{150N_w + V_1}{100}, \qquad (4)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых при проведении измерений, рассчитывается по п. 9.4.2;

V_1 – объем конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготавливаемого в запас, мм^3 (не менее 200 мм^3).

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

9.5 Подготовка проб

9.5.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Образец молока переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3 в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

От образца молока с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см^3 и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. Центрифугируют пробы в следующем режиме: 4000 g, 5 мин. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм^3 и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см^3. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 PBS–буфера с твином, приготовленного по п. 9.3.3, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

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

9.5.2 Подготовка проб сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца сухого молока отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки вместимостью 10 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью дозатора 9 см^3 дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают до полного растворения, после чего выдерживают в течение 15 мин и перемешивают.

От восстановленного как описано выше молока с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см^3 и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. Центрифугируют пробы в следующем

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь КОМПАНИЯ ХЛАБИНЕЦ ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ г. Минск
Белорусский государственный институт метрологии Экспертизы технической и нормативной документации

режиме: 4000 g, 5 мин. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм^3 и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см^3. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 PBS–буфера с твином, приготовленного по п. 9.3.3, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

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

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

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру представленного образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

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

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

От образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. В пробирки с пробами добавляют отмеренные дозатором 125 мм^3 реагента для очистки и перемешивают на вортексе в течение 30 с на максимальной скорости.

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

Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм^3 из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3. В пробирки дозатором добавляют 344 мм^3 буфера для доведения проб № 1 и тщательно перемешивают на вортексе.

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

9.5.4 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Образец масла, охлажденный до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Образец творога тщательно гомогенизируют, избегая отделения сыворотки.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альгимед г. Минск для документов
Белорусский государственный ... Отдел научно-технической ... и нормативной документации

1,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 4 см^3 PBS–буфера с твином, приготовленного по п. 9.3.3. Пробирки с пробами выдерживают на водяной бане при температуре от 50 °С до 55 °С до расплавления пробы, но не менее двух минут.

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

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см^3 из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира, и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3.

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

9.5.5 Получение разбавленных растворов проб

При получении результатов измерений проб больших, чем значение, соответствующее верхней границе диапазона градуировки (10,0 нг/см^3), согласно п. 11.2 проводят разбавление приготовленных по п. 9.5.1 – 9.5.4 растворов проб следующими растворителями:

пробы масла сливочного, сыра, творога, молока, сухого молока – PBS–буфер с твином;

пробы йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки – буфер для доведения проб № 1.

Разбавлению должны подвергаться свежеприготовленные растворы проб.

При проведении разбавления отобранные дозатором аликвоты растворов проб объемом V_a, мм^3, переносят в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3. В пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом $V_б$, мм^3, и перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Коэффициент разбавления K рассчитывается по формуле

$$K = \frac{V_a + V_б}{V_a} \qquad (5)$$

Величины V_a, $V_б$ должны соответствовать условию (6), и выбираются таким образом, чтобы концентрация стрептомицина в разбавленном растворе пробы находилась в диапазоне градуировки.

$$500 \le (V_б + V_a) \le 1000 \qquad (6)$$

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

10 Выполнение измерений

10.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.5. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с п. 9.4.

Компания Альгимед г. Минск для документов
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

10.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.4.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 50 мм^3 каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 нг/см^3). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 50 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

10.2.2 Добавление раствора антител № 1

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 100 мм^3 раствора антител № 1. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

10.2.3 Инкубация планшета

Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в помещении при условиях, указанных в разделе 7.

10.2.4 Промывка планшета

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Выливают содержимое лунок планшета путем его резкого переворачивания. Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 промывочного раствора, приготовленного по п. 9.4.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – от 3 до 4, объем заливаемого моющего раствора – 250 мм^3.

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

10.2.5 Добавление конъюгата антител с пероксидазой № 2

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют по 150 мм^3 конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготовленного по п. 9.4.4, и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.2.6 Инкубация планшета

Сразу же после добавления конъюгата антител с пероксидазой № 2 планшет помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют

КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

в течение 30 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

10.2.7 Промывка планшета

Промывают планшет в соответствии с п.10.2.4.

10.2.8 Добавление ТМВ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм^3 ТМБ–субстрата, после чего сразу же начинают отсчет времени инкубации. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

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

10.2.9 Инкубация планшета

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

10.2.10 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в лунки планшета добавляют по 100 мм^3 стоп-реагента, отмеренных дозатором, и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.2.11 Измерение оптической плотности

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

11 Обработка результатов измерения

11.1 Расчет массовой концентрации

Программное обеспечение «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанное BIOO Scientific Corporation (США), далее «программное обеспечение» производит обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса программного обеспечения.

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

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

где B – оптическая плотность раствора стрептомицина;

B_0 – оптическая плотность 1–го градуировочного раствора с концентрацией стрептомицина 0,00 нг/см^3;

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

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ Компания АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Белорусский государственный институт метрологии Отдел научно-технической информации и нормативной документации

на основании пар значений B_i/B_0 , $\ln C_i$ полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i=2..6$), C_i – концентрация i–го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям оптической плотности параллельных измерений i–го градуировочного раствора.

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

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

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, F=5.

При получении результатов измерений проб выше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки (10 нг/см^3), выполняются действия согласно п. 11.2.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.3

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

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

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием предела измерения согласно п. 12.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 12.3.

11.2 Определение массовой концентрации стрептомицина при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки

При получении результатов измерений проб больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки, проводят разбавление растворов проб согласно п. 9.5.5.

В этом случае при обработке результатов измерений массовой концентрации стрептомицина в вышеупомянутых пробах при расчете по формуле (8) для разбавленных растворов проб в качестве фактора разбавления задается значение, рассчитанное по формуле

$$F = 5 \cdot K \qquad (10)$$

где K – коэффициент разбавления, рассчитываемый по формуле (5).

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
Компания Альгимед
г.Минск
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Белорусский государственный институт м...
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

11.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

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

Рассчитывают расхождение между результатами измерений параллельных проб одного образца $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости r_{abs}. Если выполняется условие

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

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

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

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

r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 3, %.

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

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов 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

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

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

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

12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации стрептомицина с использованием предела измерения

Если конечный результат измерений оказывается меньше предела

Общество с ограниченной ответственностью КОМПАНИЯ АЛЬТИМЕД г. Минск ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Российский государственный институт метрологической информации и нормативной документации

измерения X_{LQ}, равный 5,0 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

менее X_{LQ},

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

12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации стрептомицина с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если конечный результат измерений $\overline{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL}, равное: 250,0 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации стрептомицина в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

более X_{HL},

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

13 Контроль точности результатов измерений

Контроль качества проведения измерений выполняется с периодичностью, установленной системой менеджмента качества в лаборатории, но обязательно:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, влияющих на стабильность процесса по результатам анализа контрольных карт;
- при значимых изменениях в условиях измерений (другая партия реагентов, новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.);
- при любых выявленных несоответствиях в работе лаборатории, применительно к методике выполнения измерений.

13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации стрептомицина при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 11.3.

13.2 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 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. 11.3. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\overline{X_1}, \overline{X_2}$

$$\overline{X} = \frac{\overline{X_1} + \overline{X_2}}{2} \quad (14)$$

при их соответствии условию (15)

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г. Минск для документов

Российский государственный институт метрологии Отдел научно-технической информации и нормативной документации

$$\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| \leq \mathrm{CD}_{\text{абс}}, \tag{15}$$

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 3, %.

13.3 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 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.3.

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

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

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

$$\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| \leq CD_R, \tag{18}$$

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

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

$$CD_R = 0{,}01 \cdot k \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \tag{19}$$

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

k – коэффициент, равный 1,2;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 3.

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

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕС МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Таблица 3 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Диапазон измерений, мкг/кг	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн.}$, %
от 5,0 до 250,0 включ.	10	24	19

13.4 Контроль правильности

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

Контроль правильности проводится с использованием добавок стрептомицина. Неопределенность аттестованного значения массовой концентрации стрептомицина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

13.4.1 ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавкой

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

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

где C_{ST} – концентрация раствора стрептомицина, нг/см^3;

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

m – масса навески пробы, г.

Примечание: принимается, что для сырого, пастеризованного, стерилизованного молока масса m численно равна объему аликвоты, см^3.

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

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

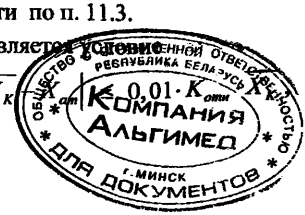
13.4.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой концентрации стрептомицина $\overline{X_K}$ в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (17) при выполнении условия повторяемости по п. 11.3.

Критерием приемлемости является условие

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





где $K_{отн.}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 3.

X_{am} – установленное значение массовой концентрации стрептомицина 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.

13.5 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.

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

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора стрептомицина, приготовленного из бензилстрептомицина калиевой или натриевой соли в соответствии с прилагаемой инструкцией. Предварительно установленная массовая концентрация стрептомицина в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку стрептомицина в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

13.5.1 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

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1{,}128 \cdot \sigma_r , \qquad (22)$$

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3{,}534 \cdot \sigma_r \qquad (23)$$

- Границы регулирования

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альгимед г. Минск Республика Беларусь для документов
Российский государственный институт Отдел научно-технической информации и нормативной документации

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3{,}686 \cdot \sigma_r \qquad (24)$$

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.

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

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)

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

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.

13.5.2 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 стрептомицина, по формуле

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

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

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

- Предупреждающие границы

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

- Границы регулирования

ООО "С.О.С. ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ" RECOVERY BELARUS КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Российский государственный институт МВД Отдел научно-технической информации и нормативной документации

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

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

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

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.

14 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
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 24104–2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336–82 Е	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г. Минск для документов
Белорусский государственный институт ... технической информации и нормативной документации

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

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ
КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД
г.МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

gost.e-ecolog.ru