СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке БелГИМ

_____ Г.А. Колюмиец

«11» _____ 2014 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Компания Альгимед»

_____ В.В. Лютынский

«10» апреля 2014 г.

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

МВИ.МН 4885-2014

Республиканское унитарное предприятие «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 829 / 2014
об аттестации МВИ от 14.04 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 5
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 11
10 Выполнение измерений 13
10.1 Общие требования 13
10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа 13
11 Обработка результатов измерения 15
11.1 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 пенициллина с использованием предела измерения 17
12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации пенициллина 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 18
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 АЛЬГИМЕО
г. МИНСК
ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

Государственный институт метр...
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 пенициллина (бензилпенициллина).

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации пенициллина с использованием набора реагентов «MaxSignal ® для определения пенициллина», каталожный номер 1065-01B («MaxSignal® Penicillin ELISA Test Kit», Reference # 1065-01B) производства BIOO Scientific Corporation (США), далее набор реагентов.

Диапазон измерений методики составляет от 1,00 до 6,00 мкг/кг. Предел измерения для данной методики составляет 1,00 мкг/кг.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Точность измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой концентрации пенициллина 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.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(ПО)}$, %	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K = 2, P = 95$ %
от 1,00 до 6,00 включ.	3,0	5,2	7	14

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 и ценой деления 0,0001 г

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

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Отдел научно-технической информации 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.

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 частоту вращения 4000 об/мин (пробирки вместимостью 2 и 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^3 типа

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.

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.

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Набор реагентов «MaxSignal® для определения пенициллина», каталожный номер 1065-01B («MaxSignal® Penicillin ELISA Test Kit», Reference # 1065-01B) производства BIOO Scientific Corporation (США) – набор реактивов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению концентрации пенициллина 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 пенициллином)	1 шт
Основной стандарт пенициллина (бензилпенициллина, пенициллина G) массой 1000 нг (порошок) для приготовления градуировочных растворов	2 шт
Флаконы для приготовления градуировочных растворов пенициллина с концентрацией 0 нг/$см^3$, 0,08 нг/$см^3$, 0,20 нг/$см^3$, 0,40 нг/$см^3$, 0,80 нг/$см^3$, 1,20 нг/$см^3$	6 шт
Раствор белка, связывающего пенициллин (10× концентрат)	1,8 $см^3$
Буфер 1 для разбавления градуировочных растворов молока	15 $см^3$
HRP-конъюгат антител № 2 (200× концентрат)	0,1 $см^3$
Растворитель для антител № 2	20 $см^3$
Экстракционный буфер для пенициллина (10× концентрат)	2×25 $см^3$
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 $см^3$
Стоп-реагент	14 $см^3$
ТМБ субстрат	12 $см^3$
Буфер для доведения проб (10× концентрат)	10 $см^3$

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;
- экстракционный буфер для пенициллина;
- промывочный раствор;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

4 Метод измерений

Используемый метод основан на конкурентном колориметрическом

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

иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого пенициллином, вместе с пробой добавляют белок, высоко-афинный к захвату пенициллина. Присутствующий в пробе пенициллин конкурирует с пенициллином, нанесенным на стенки лунок, за связывание с белком. После внесения вторичных антител, коньюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с белком, связанными с пенициллином 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 пенициллина в градуировочном растворе и пенициллина в растворе пробы. Массовая концентрация пенициллина 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}C до плюс 25 ^{0}C;
- температура при приготовлении растворов (20 ± 2) ^{0}C;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °C.

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}C до плюс 25 ^{0}C;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшеты;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;

Общество с ограниченной ответственностью КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г. Минск для документов

- 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 экстракционного буфера для пенициллина

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

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата экстракционного буфера для пенициллина рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{0{,}8N_1 + 2N_2 + 6N_3 + V_1}{10}$$

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

где N_1 – количество анализируемых образцов молока;

N_2 – количество анализируемых образцов масла сливочного, сыра или творога;

N_3 – количество анализируемых образцов молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны;

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

Экстракционный буфер для пенициллина приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.2 Приготовление буфера для доведения проб

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 приливают дозатором аликвоту 10× концентрата буфера для доведения проб, добавляют цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата буфера для доведения проб рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{2N_3 + V_1}{10}, \qquad (2)$$

где N_3 – количество анализируемых образцов молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны;

V_1 – объем буфера для доведения проб, приготавливаемого в запас, см^3 (не менее 0,5 см^3).

Буфер для доведения проб 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 температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С от 1 до 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

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

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

9.4.2 Подготовка микротитровального планшета

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

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альтимед Беларусь г. Минск для документов
Государственный институт метрологии Отдел научно-технической информации и нормативной документации

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 основного раствора пенициллина с концентрацией 1000 нг/см^3

К содержимому флакона с основным стандартом пенициллина добавляют отмеренные дозатором дозатором 1,0 см^3 экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 9.3.1. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 30 с. Основной раствор пенициллина делят на аликвоты для приготовления в соответствии с п. 9.4.5 раствора пенициллина с концентрацией 20 нг/см^3, которые хранят при температуре не выше минус 18 °С не более месяца. Остатки аликвот после использования дальнейшему хранению не подлежат.

9.4.4 Приготовление основного раствора пенициллина с концентрацией 20 нг/см^3

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см^3 добавляют 0,98 см^3 экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 9.3.1, и 20 мм основного раствора пенициллина с концентрацией 1000 нг/см^3, приготовленного по п. 9.4.3. Раствор перемешивают на вортексе в течение 30 с. Раствор приготавливается перед проведением анализа и хранения не подлежит.

9.4.5 Приготовление градуировочных растворов пенициллина

Градуировочные растворы пенициллина готовят путем последовательного разбавления основного раствора пенициллина с концентрацией 20 нг/см^3, *приготовленного по п. 9.4.4, следующим образом.*

В соответствующий флакон для хранения градуировочных растворов вносят аликвоту раствора пенициллина и аликвоту растворителя для приготовления градуировочных растворов. Раствор пенициллина, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот раствора и растворителя, используемые для приготовления градуировочных растворов, указаны в таблице 3. В качестве растворителя используется:

- для проб молока – буфер 1 для разбавления градуировочных растворов молока;
- для всех остальных проб – экстракционный буфер для пенициллина, приготовленный по п. 9.3.1.

Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Общество с ограниченной ответственностью Компания Фальгимед г. Минск для документов
Белорусский государственный институт метрологии Отдел технической информации и нормативной документации

Полученные градуировочные растворы пенициллина хранению не подлежат и должны быть использованы в течение дня. После использования остатки градуировочных растворов должны быть удалены из флаконов, подлежащих хранению. Пустые флаконы должны храниться в составе набора реагентов в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С и использоваться при последующем приготовлении градуировочных растворов.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов

Номер град. раствора	Концентрация градуировочного раствора, нг/см^3	Источник аликвоты раствора пенициллина для приготовления градуировочного раствора	Объем аликвоты раствора пенициллина	Объем растворителя для приготовления градуировочных растворов
6	1,20	основной раствор с концентрацией 20 нг/см^3	60 мм^3	940 мм^3
5	0,80	град. раствор № 6	500 мм^3	250 мм^3
4	0,40	град. раствор № 5	500 мм^3	500 мм^3
3	0,20	град. раствор № 4	500 мм^3	500 мм^3
2	0,08	град. раствор № 3	500 мм^3	750 мм^3
1	0,00	–	–	500 мм^3

9.4.6 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.

9.4.7 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 10 мм^3, добавляют дозатором в 199 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для антител № 2. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения закрытой пробирки.

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

$$V = \frac{150 N \cdot V}{200}$$

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

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.

9.4.8 Приготовление раствора белка, связывающего пенициллин

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см^3 отбирают дозатором аликвоту 10× концентрата раствора белка, связывающего пенициллин, добавляют дозатором в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 9.3.1. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения закрытой пробирки.

Объем используемой аликвоты V, см^3, концентрата рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле

$$V = \frac{100N_w + V_1}{10}, \qquad (5)$$

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

V_1 – объем раствора белка, связывающего пенициллин, приготавливаемого в запас, мм^3 (не менее 100 мм^3).

Раствор белка, связывающего пенициллин, 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 разделом 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 об/мин, 10 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 экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 9.3.1, 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.

Общество с ограниченной ответственностью Компания Альгимед г. Минск для документов
Государственный институт метрологической технической информационной и нормативной документации

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 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 об/мин, 10 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 $мм^3$ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 9.3.1, 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 1,0 $см^3$ буфера для доведения проб, приготовленного по п. 9.3.2, 3,0 $см^3$ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 9.3.1, и перемешивают на вортексе в течение 3 мин на максимальной скорости.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: 4000 об/мин, 5 мин.

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

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА

Общество с ограниченной ответственностью КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕКС г. МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

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 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 $см^3$ экстракционного буфера для пенициллина, приготовленного по п. 9.3.1. 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 об/мин, 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.

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.

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, приготовленного согласно п. 9.4.5. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00, 0,08, 0,20, 0,40, 0,80, 1,20 $нг/см^3$). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 50 $мм^3$ двух параллельных проб каждого образца.

10.2.2 Добавление раствора белка, связывающего пенициллин

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором

100 мм^3 раствора белка, связывающего пенициллин, приготовленного по п. 9.4.8. 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. 9.4.6, 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. 9.4.7, 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 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.

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г. Минск для документов
Государственный комитет по стандартизации Отдел научно-технической информации и нормативной документации

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

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 пенициллина вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \qquad (6)$$

где B – оптическая плотность раствора пенициллина;

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

C – концентрация пенициллина в растворе, нг/см^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК на основании пар значений B_i/B_0 , $\ln C_i$ полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i = 2..6$), C_i – 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 пенициллина в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right), \qquad (7)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, $F = 5$.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г. Минск * Для документов *
Государственный институт метрологии Отдел научно-технической информации и нормативной документации

значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.1

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (8)$$

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

Окончательный результат измерений округляют до второго десятичного знака.

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

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

11.1 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

$$|X_1 - X_2| \le r_{abs}, \quad (9)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\overline{X}$, рассчитанное по формуле (8).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \overline{X}, \quad (10)$$

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 (9) 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

$\overline{X} \pm U$, мкг/кг,

при доверительной вероятности P = 0,95, КО

где $\overline{X}$ – результат измерений, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 11;

КОМПАНИЯ АЛЬТИМЕД г.МИНСК ДОКУМЕНТОВ

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

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

$$U(X) = 0{,}01 \cdot U \cdot \overline{X}, \qquad (11)$$

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 пенициллина с использованием предела измерения

Если конечный результат измерений $\overline{X}$ оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ} , равный 1,00 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации пенициллина 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 пенициллина с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если конечный результат измерений $\overline{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , равное 6,00 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации пенициллина 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 пенициллина при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 11.

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

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

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X_1} + \overline{X_2}}{2}, \tag{12}$$

при их соответствии условию (13)

$$\left|\overline{X_1} - \overline{X_2}\right| \le \mathrm{CD}_{\text{абс}}, \tag{13}$$

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

$$CD_{\text{абс}} = 0{,}01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \tag{14}$$

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

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. 11.1.

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

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} \tag{15}$$

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

$$\left|\bar{X}_1 - \bar{X}_2\right| \le CD_R, \tag{16}$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (15), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

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

$$CD_R = 0{,}01 \cdot k \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \quad (17)$$

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

k – коэффициент, равный 1,4;

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.

Таблица 4 – 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 1,00 до 6,00 включ.	9	14	14

13.4 Контроль правильности

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

Контроль правильности проводится с использованием добавок пенициллина. Неопределенность аттестованного значения массовой концентрации пенициллина 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 пенициллина в которой менее предела измерения данной МВИ, в которую внесена добавка раствора пенициллина. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации пенициллина X_{am} в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (18)$$

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

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

m – масса навески пробы, г.

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

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

Для внесения добавки используется раствор пенициллина, приготовленный из бензилпенициллина калиевой или натриевой соли 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 %.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ
Государственный институт метрологии Отдел научно-технической информации и нормативной документации 19

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 пенициллина $\overline{X_K}$ в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (15) при выполнении условия повторяемости по п. 11.1.

Критерием приемлемости является условие

$$\left|\overline{X_K} - X_{am}\right| \le 0{,}01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{X_K}\,, \qquad (19)$$

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

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

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (19) 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 пенициллина, приготовленного из бензилпенициллина калиевой или натриевой соли в соответствии с прилагаемой инструкцией. Предварительно установленная массовая концентрация пенициллина в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку пенициллина в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

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

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

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1{,}128 \cdot \sigma_r, \tag{20}$$

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2{,}834 \cdot \sigma_r \tag{21}$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3{,}686 \cdot \sigma_r \tag{22}$$

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 (23), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \tag{23}$$

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 (23), (24)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^{N} W_i \Big/ N}{d_2}, \tag{24}$$

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

$$\overline{\mathrm{Re}c} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Re}c_i}{N}, \tag{25}$$

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 пенициллина, по формуле

Общество с ограниченной ответственностью Республика Беларусь Компания Альгимед г. Минск для документов
Государственный комитет по стандартизации Отдел научно-технической информации и нормативной документации

$$\mathrm{Re}c_i = \frac{X_i}{X_{\text{exp}}} \cdot 100, \qquad (26)$$

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

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 2 \cdot S_{REC}, \qquad (27)$$

- Границы регулирования

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 3 \cdot S_{REC} \qquad (28)$$

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

$$S_{REC} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left(\overline{\mathrm{Re}c} - \mathrm{Re}c_i\right)^2}{N-1} \qquad (29)$$

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 (26), 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

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

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

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

gost.e-ecolog.ru