Национальная академия наук Беларуси

Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора по науке
Белорусского государственного
института метрологии
_____ Т.А.Кононовец
«21» 02 2014

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института
биоорганической химии НАН
Беларуси
_____ С.А.Усанов
«___» _____ 2014г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРАМФЕНИКОЛА В СЫРЬЕ И ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ»

МВИ.МН 4846-2014

ОРИГИНАЛ

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 824 /2014
об аттестации МВИ от 21.02.2014 г.

РАЗРАБОТАНО

ГУ «Белорусский государственный ветеринарный центр» Минсельхозпрода РБ
Директор
_____ А.М.Аксенов
«___» _____ 2013г.
Начальник отдела
_____ Т.А.Позняк
Начальник отдела
_____ А.А.Русинович

Институт биоорганической химии НАН Беларуси
Заместитель директора по научной и инновационной работе
_____ Е.Н.Калиниченко
«___» _____ 2013г.
Заведующий лабораторией
_____ О.В.Свиридов
Ведущий научный сотрудник
_____ И.И.Вашкевич

МИНСК 2014

gost.e-ecolog.ru

Национальная академия наук Беларуси

Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора по науке
Белорусского государственного
института метрологии
_____ Г.А.Колемиец
«21» 01 2014 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института
биоорганической химии НАН
Беларуси
_____ С.А.Усанов
«___» _____ 2014 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРАМФЕНИКОЛА В СЫРЬЕ И ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРА РЕАГЕНТОВ «ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ»

МВИ.МН 4846-2014

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 824 / 2014
об аттестации МВИ от 21.02. 2014 г.

РАЗРАБОТАНО

ГУ «Белорусский государственный ветеринарный центр» Минсельхозпрода РБ
Директор
_____ А.М.Аксенов
«___» _____ 2013г.
Начальник отдела
_____ Т.А.Позняк
Начальник отдела
_____ А.А.Русинович

Институт биоорганической химии НАН Беларуси
Заместитель директора по научной и инновационной работе
_____ Е.Н.Калиниченко
«___» _____ 2013г.
Заведующий лабораторией
_____ О.В.Свиридов
Ведущий научный сотрудник
_____ И.И.Вашкевич

МИНСК 2014

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения 3
2 Сущность метода 3
3 Показатели точности методики измерений 4
4 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы 4
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов 7
5.1 Общие требования безопасности 7
5.2 Требования к квалификации операторов 7
6 Условия выполнения измерений 7
7 Правила работы с набором 7
8 Условия хранения набора реагентов 8
9 Подготовка к выполнению измерений 8
9.1 Отбор образцов продуктов 8
9.2 Подготовка лабораторной посуды 9
9.3 Приготовление растворов 9
9.4 Подготовка набора реагентов 10
9.5 Подготовка проб продуктов 11
10 Выполнение измерений 13
11 Обработка результатов измерений 14
11.1 Расчет массовой концентрации хлорамфеникола 14
11.2 Контроль холостой пробы 16
11.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости 16
12 Оформление результатов измерений 17
12.1 Форма представления результатов в виде односторонней оценки концентрации хлорамфеникола 17
12.2 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности 17
13 Контроль точности результатов измерений 18
13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости 18
13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 18
13.3 Контроль правильности 19
13.4 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 20
14 Нормативные ссылки 23
15 Библиография 24

1 Область применения

Данная методика предназначена для определения остаточных количеств хлорамфеникола в пищевых продуктах и продовольственном сырье животного происхождения - мышечной ткани теплокровных и рыбы, молоке (молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное), пробах сухих молочных продуктов (молоко сухое цельное или обезжиренное, сыворотка молочная сухая), яйце, меде, а также в жидких молочных продуктах (йогурт, сливки, ряженка, сметана, мороженое, кефир) методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ» производства Института биоорганической химии НАН Беларуси и УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» [1].

Диапазон измерений методики составляет:

- для мышечной ткани теплокровных и рыбы, молока сырого, сухих молочных продуктов* (молоко сухое цельное или обезжиренное, сыворотка молочная сухая), яиц, меда – от 0,20 до 5,00 мкг/кг (мкг/дм^3);
- для жидких молочных продуктов (йогурт, сливки, ряженка, сметана, мороженое, кефир) – от 0,20 до 10,00 мкг/кг (мкг/дм^3).

Предел обнаружения – 0,10 мкг/кг (мкг/дм^3),

предел измерения – 0,20 мкг/кг (мкг/дм^3).

Настоящая методика разработана в соответствии с ГОСТ 8.010.

2 Сущность метода

Принцип работы набора состоит в следующем. В лунках планшетного иммуносорбента, содержащих внесенные компоненты набора и анализируемые пробы, во время инкубации конъюгат хлорамфеникол-пероксидаза и хлорамфеникол в составе пробы конкурируют за связывание с поликлональными антителами к хлорамфениколу, биоспецифически иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Чем больше содержится хлорамфеникола в пробе, тем меньше конъюгата связывается с антителами на твердой фазе. После удаления несвязавшихся реагентов промывочным раствором в лунки вносят раствор субстрата пероксидазы (пероксид водорода) и хромогена (ТМБ). Развивается цветная реакция, которую останавливают путем добавления стоп-реагента (0,5 М раствор серной кислоты). Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют многоканальным микропланшетным фотометром как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП обратно пропорциональна концентрации хлорамфеникола в пробе.

Массовая концентрация хлорамфеникола в анализируемом образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

---

*Здесь и далее по тексту результаты измерений массовой концентрации хлорамфеникола в сухих молочных продуктах относятся к восстановленным согласно данной методике продуктам.

3 Показатели точности методики измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение концентрации хлорамфеникола в указанном выше диапазоне с показателями точности, представленными в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и воспроизводимости

Диапазон измерений, мкг/кг (мкг/дм^3)	Относительное стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, σ_R ,%
от 0,20 до 5,00 включ. от 0,20 до 10,00 включ. (для жидких молочных продуктов)	9,3	10,7

Для всех видов продуктов была установлена незначимость смещения во всем диапазоне измерений.

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

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

Диапазон измерений, мкг/кг (мкг/дм^3)	Относительная суммарная стандартная неопределенность, u_c , %	Относительная расширенная неопределенность U, %, К=2, Р=95%
от 0,20 до 5,00 включ. от 0,20 до 10,00 включ. (для жидких молочных продуктов)	11	22

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

показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2;

показатели правильности – СТБ ИСО 5725-4;

оценки неопределенности [2].

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

- весы лабораторные общего назначения высокого класса точности по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200,0 г, ценой деления не более 0,01г;

- микропланшетный фотометр, позволяющий измерять ОП раствора в лунках планшета в диапазоне (0,00 – 3,00) ОЕ с погрешностью до 2 % при длине волны 450 нм;

- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов, 8- или 12- канальное (не обязательно), с диапазоном объемов дозирования моющего раствора, заливаемого в каждую лунку, от 100 до 300 мм^3;

- мешалка магнитная с диапазоном скоростей вращения 0-1200 об/мин;

- баня водяная, позволяющая поддерживать температуру 40 °С ± 5 °С;

- баня ультразвуковая с частотой ультразвука 40 кГц ;

- гомогенизатор тканей лабораторный или блендер бытовой;

- шейкер, обеспечивающий частоту вращения до 300 об/мин;

- вортекс лабораторный, обеспечивающий частоту вращения до 3000 об/мин;

- центрифуга лабораторная с охлаждением до плюс 4 °С и относительным центробежным ускорением до 4000 g;

- холодильник бытовой с поддерживаемой температурой от плюс 2 °С до плюс 8 °С и морозильная камера с поддерживаемой температурой не выше минус 18 °С;

- система для сухого выпаривания проб в токе азота с регуляцией температуры (50 – 60) °С;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей от 0,01 см^3 до 5,0 см^3, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- пипетки 8 - канальные автоматические со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 0,3 см^3, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

- цилиндры мерные вместимостью 25 и 50 см^3 по ГОСТ 1770;

- колбы мерные вместимостью 10, 20, 25 и 50 см^3 по ГОСТ 1770;

- стаканы мерные вместимостью 50, 100 и 500 см^3 по ГОСТ 25336;

- флакон из пластмассы вместимостью 20 см^3 с завинчивающейся крышкой (например, Митра, ВМ 20);

- секундомер или часы по ТНПА производителя;

- ванночки (кюветы) для реагентов вместимостью 60 см^3 или чашки Петри для отбора жидкостей многоканальной пипеткой (например, Sarstedt, каталожный номер 95.1298.001);

- изолирующая пленка для заклеивания планшетов или крышка;

- бумага фильтровальная лабораторная марки «Ф» по ГОСТ 12026;

- перчатки хирургические резиновые или пластиковые;

- вода дистиллированная или деионизованная;

- пробирки полипропиленовые центрифужные вместимостью 50 и 15 см^3, пробирки мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 10 см^3, пробирки

стеклянные для выпаривания вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$, штативы для пробирок;

- пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 1,5-2,2 $см^3$;
- гексан ч.д.а. по [3] ;
- этилацетат (для ГХ) по ГОСТ 22300;
- цинк сернокислый 7-водный ч по ГОСТ 4174;
- калий железистосинеродистый 3-водный ч.д.а. по ГОСТ 4207;
- азот газообразный повышенной чистоты 1 сорт по ГОСТ 9293.

Набор реагентов «ИФА-ХЛОРАМФЕНИКОЛ» производства Института биоорганической химии НАН Беларуси и УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» по [1] в составе:

Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
Градуировочные пробы (C_0–C_5), в диапазоне концентраций хлорамфеникола (0–5,00) $нг/см^3$ (0; 0,05; 0,10; 0,30; 1,00; 5,00 $нг/см^3$)	6 микропробирок или флаконов по 0,6 $см^3$
Контрольная проба набора (КПН), сухой порошок; диапазон измерения концентраций хлорамфеникола после восстановления пробы путем добавления воды указан на этикетке	1 микропробирка или флакон, лиофилизовано из 0,8 $см^3$
Конъюгат хлорамфеникола и пероксидазы из корней хрена, концентрат	1 микропробирка или флакон, 0,7 $см^3$
Раствор для разведения конъюгата	1 флакон, 10 $см^3$
Раствор для разведения исследуемых проб, концентрат	1 флакон, 20 $см^3$
Промывочный раствор, концентрат	1 флакон, 20 $см^3$
Субстратный буферный раствор	1 флакон, 14 $см^3$
Раствор ТМБ (хромоген; 3,3',5,5'-тетраметилбензидин)	1 флакон, 0,7 $см^3$
Стоп-реагент	1 флакон, 14 $см^3$

Примечание.

Нижеперечисленные компоненты набора включаются в его состав по запросу:

- раствор хлорамфеникола («спайк-раствор»), концентрация хлорамфеникола 10 $нг/см^3$, 1 флакон, 4 $см^3$;
- хромоген-субстратный раствор в виде готового к использованию одного компонента вместо раствора ТМБ и субстратного буферного раствора, 1 флакон, 14 $см^3$;
- раствор для разведения исследуемых проб в объеме от 20 $см^3$ до 100 $см^3$ во флаконе соответствующей вместимости.

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

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

Оператор должен знать и строго соблюдать 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, изложенной в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений.

Все работы с растворителями должны проводиться строго в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты. Запрещается работать при выключенной приточно-вытяжной вентиляции и без средств индивидуальной защиты.

Градуировочные пробы хлорамфеникола, субстратный буфер, содержащий перекись водорода, раствор хромогена, включающий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, и стоп-реагент, представляющий собой раствор (5%) серной кислоты относят к веществам, которые могут проявлять токсические свойства. Поэтому при работе необходимо соблюдать правила работы с токсичными веществами.

При попадании стоп-реагента на кожу или в глаза смыть кислоту большим количеством воды.

5.2 Требования к квалификации операторов

К выполнению работ по данной методике допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа.

6 Условия выполнения измерений

Температура окружающего воздуха в лаборатории от 20 °С до 25 °С, в комнате постановки ИФА – от 22 °С до 25 °С. Относительная влажность воздуха – не более 80 % при температуре воздуха 25 °С.

7 Правила работы с набором

Перед постановкой ИФА все компоненты набора должны быть доведены до комнатной температуры.



Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость. Реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником к пипетке.

Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента, а также реагентов в лунке. Во всех случаях следует избегать образования пены.

Если проведение ИФА начато, то все последовательные стадии следует заканчивать, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени. Необходимо исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на поверхность иммуносорбента и жидкие реагенты набора.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора. Следует иметь в виду, что для каждого иммуносорбента необходимо построение своего независимого градуировочного графика и измерение концентрации хлорамфеникола в КПН.

Не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий и использование реагентов из наборов других производителей.

8 Условия хранения набора реагентов

Набор должен храниться в упаковке изготовителя при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности. Допустимо хранение набора при температуре до 25 °С не более 3 сут. Замораживание целого набора и отдельных компонентов не допускается.

Концентраты конъюгата, раствора для разведения исследуемых проб и промывочного раствора, а также субстратный буферный раствор, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов и последующей укупорки можно хранить при температуре (2–8) °С в течение срока годности набора.

Неиспользованные стрипы иммуносорбента следует хранить упакованными в плотно закрытом фольгированном пакете.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов продуктов

Отбор образцов для исследования проводят по СТБ 1036 или другим техническим нормативно-правовым актам, утвержденным в установленном порядке. Отобранные образцы продуктов хранят при температуре (2–8) °С не более 48 ч. Образцы молока сырого и восстановленных сухих молочных продуктов хранят при температуре (2–8) °С не более 24 ч. Допускается замораживание образцов до температуры не выше минус 20 °С не более одного раза и хранение в течение 14 дней. Пробу каждого образца молока сырого и восстановленных сухих молочных продуктов необходимо отбирать

отдельным наконечником к пипетке. Перед проведением подготовки проб по п. 9.5 замороженные образцы должны быть размерожены при температуре (2–8) °С.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

Вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной или деионизованной водой. Флаконы для приготовления хромоген-субстратного раствора отмывают без применения синтетических моющих средств.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление контрольной пробы набора

Во флакон с сухим порошком КПН прибавляют 0,8 $см^3$ деионизованной воды, нагретой до температуры (40 ± 2) °С, и аккуратно перемешивают на вортексе, избегая образования пены. До начала анализа оставляют продукт в восстановленном виде минимум на 15 минут. Хранят раствор контрольной пробы при (2–8) °С не более 1 суток. Замораживание пробы не допускается.

9.3.2 Приготовление рабочего промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора интенсивно встряхивают в течение (10–20) с, в случае образования кристаллов – подогревают на водяной бане при температуре не выше 40 °С или помещают в ультразвуковую баню до исчезновения кристаллов. Разводят нужный объем раствора в 10 раз (соотношение по объему 1+9) деионизованной водой. Для этого в мерный стакан пипеткой отбирают необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов, добавляют отмеренный цилиндром необходимый объем деионизованной воды и перемешивают полученный рабочий раствор на магнитной мешалке. При использовании мерной колбы пипеткой отбирают необходимый объем концентрата, добавляют половину требуемого объема воды, перемешивают, доводят до метки, еще раз перемешивают. Приготовленный раствор можно хранить при (2–8) °С в течение 1 месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.3.3 Приготовление рабочего раствора для разведения исследуемых проб

Содержимое флакона с концентратом раствора для разведения исследуемых проб продуктов интенсивно встряхивают в течение (10–20) с. В случае образования кристаллов – подогревают на водяной бане при температуре не выше 40 °С или помещают в ультразвуковую баню до исчезновения кристаллов. Разбавляют нужный объем раствора в 5 раз (соотношение по объему 1+4) деионизованной водой. Для этого в мерный стакан пипеткой отбирают необходимый объем концентрата, заданный количеством подлежащих разведению исследуемых проб продуктов (пп. 9.5.1, 9.5.3-9.5.6), добавляют отмеренный цилиндром необходимый объем деионизованной воды и перемешивают полученный рабочий раствор на магнитной мешалке. Приготовленный раствор можно хранить при (2-8) °С в течение 1 месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.3.4 Приготовление рабочего раствора конъюгата

ВНИМАНИЕ! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием! Раствор хранению не подлежит!

Исходный концентрат конъюгата после отбора аликвоты для разведения следует сразу же поместить в холодильник.

Концентрат разводят в 11 раз (соотношение по объему 1+10) раствором для разведения конъюгата из расчета 50 мм^3 разбавленного раствора на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон или микроцентрифужную пробирку вносят необходимое количество раствора для разведения и добавляют заданное количество концентрата конъюгата, тщательно перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены.

9.3.5 Приготовление хромоген-субстратного раствора.

ВНИМАНИЕ! Хромоген-субстратную смесь готовят во флаконах из темного стекла или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием! Приготовленный раствор хранению не подлежит!

Раствор ТМБ разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1+20) из расчета 100 мм^3 на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 см^3 вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют соответствующее количество раствора ТМБ и интенсивно перемешивают в течение (30–40) с на вортексе.

Примечание: субстратный буферный раствор и раствор ТМБ могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.

Приготовленный или поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. При работе использовать только новые наконечники.

9.3.6 Приготовление раствора Карреза 1

Навеску калия железистосинеродистого 3-водного массой 7,60 г помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, растворяют в половине требуемого объема воды, доводят до метки, перемешивают. Раствор хранят не более 7 дней в холодильнике.

9.3.7 Приготовление раствора Карреза 2

Навеску цинка сернокислого 7-водного массой 15,00 г помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, растворяют в половине требуемого объема воды, доводят до метки, перемешивают. Раствор хранят не более 3 месяцев в холодильнике.

9.4 Подготовка набора реагентов

Перед проведением ИФА готовые компоненты набора и подготовленные к работе растворы (п.9.5) выдерживают при комнатной

температуре (20–25) °С в течение не менее 30 мин. Перед использованием жидкие реагенты тщательно перемешивают легким встряхиванием.

9.5 Подготовка проб продуктов

9.5.1 Подготовка проб мышечной ткани

Исследуемые образцы мышечной ткани млекопитающих, рыбы или птицы в случае необходимости освобождают от жира и соединительной ткани, кожи и чешуи. Образец гомогенизируют, отбирают две параллельные навески массой (3,00 ± 0,01) г вносят в центрифужные пробирки вместимостью 50 $см^3$, добавляют в каждую пробирку 3 $см^3$ воды и 6 $см^3$ этилацетата. После интенсивного десятиминутного перемешивания на шейкере (300 об/мин) пробирки центрифугируют 10 минут при 3000 g и температуре 10 °С. Из каждой пробирки отбирают 2 $см^3$ надосадочной жидкости, переносят в чистые стеклянные пробирки и выпаривают досуха в токе азота при температуре 55 °С. Сухой остаток в каждой пробирке растворяют в 1 $см^3$ гексана, добавляют 1 $см^3$ раствора для разведения исследуемых проб, приготовленного по п. 9.3.3, и интенсивно перемешивают на вортексе. Затем центрифугируют 10 минут при 3000 g и температуре 10 °С. Верхний слой (гексан) и слой жира между гексаном и водным раствором отбрасывают, а растворы используют для анализа. Допускается хранение подготовленных проб при температуре (20–25) °С в течение двух часов. В протоколе обозначают пробу аббревиатурой «МТ». Фактор разведения 1.

9.5.2 Подготовка проб молока сырого

Образцы сырого, стерилизованного или пастеризованного молока перемешивают, не допуская вспенивания. Отбирают две параллельные пробы молока объемом 10 $см^3$ в чистые центрифужные пробирки вместимостью 15 $см^3$, центрифугируют 10 мин при 3000 g и температуре 4 °С. Шпателем удаляют верхний жировой слой. Из каждой пробы отбирают некоторый объем (1-5 $см^3$) обезжиренного молока с помощью дозатора с чистым наконечником и переносят в чистую пробирку. Допускается хранение подготовленных проб при температуре (20–25) °С в течение часа. В протоколе обозначают пробу аббревиатурой «МО». Фактор разведения 1.

9.5.3 Подготовка проб восстановленных сухих молочных продуктов

Приготавливают пробу молока сухого цельного или обезжиренного, сыворотки молочной сухой. Сухой образец восстанавливают в соответствии с ГОСТ 29245, п. 3.4, или с применением градуированных стеклянных пробирок по ГОСТ 1770 следующим образом. В пробирки вместимостью 10 $см^3$ вносят две параллельные навески анализируемых образцов сухого цельного молока или сыворотки массой (1,25 ± 0,01) г, или сухого обезжиренного молока (0,90 ± 0,01) г. В пробирки приливают маленькими порциями деионизованную воду, нагретую до температуры (40 ± 2) °С, при постоянном перемешивании на вортексе. После того, как растворы остынут до комнатной температуры, доводят объем в каждой пробирке

деионизованной водой до метки (10 см^3) и еще раз перемешивают. Допускается хранение подготовленных проб в восстановленном виде при температуре (20–25) °С в течение двух часов. В протоколе кодируют пробу аббревиатурой «МС». Фактор разведения 1.

9.5.4 Подготовка проб жидких молочных продуктов

Приготавливают пробу йогурта, кефира, ряженки, сметаны, мороженого, сливок. В центрифужные пробирки вместимостью 50 см^3 вносят две параллельные навески массой (10,00 ± 0,01) г гомогенизированного образца. В каждую пробирку добавляют 8 см^3 раствора для разведения исследуемых проб, приготовленного по п. 9.3.3, тщательно перемешивают на вортексе. Далее добавляют к каждой пробе по 1 см^3 растворов Карреза 1 и Карреза 2, тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе. Центрифугируют пробирки 10 минут при 3000 g и температуре 4 °С. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают по 3 см^3 надосадочной жидкости и переносят в чистые центрифужные пробирки вместимостью 15 см^3. К растворам добавляют 6 см^3 этилацетата. Пробы перемешивают 10 минут на шейкере (300 об/мин) и центрифугируют 10 минут при 3000 g и температуре 10°С. Из каждой пробирки переносят 2 см^3 этилацетатного слоя в чистые стеклянные пробирки и выпаривают досуха в токе азота при температуре 55 °С. Сухие остатки каждой параллельной пробы растворяют в 1 см^3 раствора для разведения исследуемых проб, приготовленного по п.9.3.3, и используют для ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре (20–25) °С в течение двух часов. В протоколе обозначают пробу аббревиатурой «МП». Фактор разведения 2.

9.5.5 Подготовка проб яиц

В центрифужные пробирки вместимостью 15 см^3 вносят две параллельные навески гомогенизированного сырья массой (2,00 ± 0,01) г, добавляют 6 см^3 этилацетата, интенсивно перемешивают 10 минут на шейкере (300 об/мин) и центрифугируют 10 минут при 3000 g и температуре 10°С. После центрифугирования из каждой пробирки отбирают 3 см^3 надосадочной жидкости, переносят в чистые стеклянные пробирки и выпаривают досуха в токе азота при температуре 55 °С. Сухие остатки проб растворяют в 1 см^3 гексана, добавляют 1 см^3 раствора для разведения исследуемых проб, приготовленного по п.9.3.3, и интенсивно перемешивают. Снова центрифугируют 10 минут при 3000 g и температуре 10 °С. После центрифугирования верхний слой (гексан) и слой жира между гексаном и водным раствором отбрасывают, а растворы используют для ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре (20–25) °С в течение двух часов. В протоколе обозначают пробу аббревиатурой «ЯЦ». Фактор разведения 1.

9.5.6 Подготовка проб меда

В центрифужные пробирки вместимостью 15 см^3 вносят две параллельные навески меда массой (2,00 ± 0,01) г меда и растворяют в 4 см^3

теплой воды (40 ± 2 °С). В каждую пробирку добавляют 4 $см^3$ этилацетата, интенсивно перемешивают 10 минут на шейкере (300 об/мин) и центрифугируют 10 минут при 3000 g и комнатной температуре или температуре 10°С. После центрифугирования из каждой пробы отбирают 2 $см^3$ верхнего этилацетатного слоя, переносят в чистую стеклянную пробирку и выпаривают досуха в токе азота при температуре 55 °С. К сухому остатку в пробирках добавляют 1 $см^3$ раствора для разведения исследуемых проб, приготовленного по п.9.3.3, перемешивают на вортексе и используют для ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре (20–25) °С в течение двух часов. В протоколе пробе присваивают код «МД». Фактор разведения 1.

10 Выполнение измерений

Составляют протокол маркировки лунок иммуносорбента для внесения в двух параллелях каждого градуировочного раствора и контрольной пробы набора, а также приготовленных параллельных растворов проб исследуемых продуктов.

Вносят в лунки (в соответствии с присвоенной маркировкой) аликвоты объемом 50 $мм^3$ градуировочных проб хлорамфеникола (в порядке возрастания их концентраций), затем две аликвоты объемом 50 $мм^3$ КПН, приготовленной по п. 9.3.1, и по 50 $мм^3$ подготовленных к анализу (п.9.5.1–9.5.5) параллелльных проб продуктов.

Во все лунки вносят по 50 $мм^3$ раствора конъюгата в рабочем разведении (п. 9.3.4). Перемешивают содержимое лунок пятью-шестью круговыми движениями планшета по поверхности стола.

ВНИМАНИЕ! Суммарное время внесения всех реагентов не должно превышать 5 минут с тем, чтобы минимизировать возможные артефакты, обусловленные разным временем протекания иммунохимической реакции в первых и последних лунках. Не рекомендуется одновременно использовать более 4-х стрипов.

Планшет заклеивают изолирующей пленкой или закрывают крышкой и инкубируют при комнатной температуре (22–25) °С в течение 1 ч.

После окончания инкубации проводят 4-кратную промывку планшета приготовленным промывочным раствором (п. 9.3.2) с помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки, добавляя в каждую лунку по 250 $мм^3$ раствора. При ручной промывке удаляют содержимое из всех лунок путем резкого переворачивания планшета или аспирации 8-канальной пипеткой, затем все лунки промывают 4 раза раствором для промывания планшета и удаляют остатки влаги, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

Необходимо соблюдать следующие требования к промыванию планшета:

- при использовании автоматического или полуавтоматического устройства выполнять промывку в соответствии с прилагаемой программой;

- на всех этапах промывания контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости из них;

- не допускать переполнения лунок и перетекания жидкости между ними;

- выдерживать лунки, заполненные раствором для отмывания планшетов, не менее 10 с, но не более 1 минуты.

Некачественное промывание планшета приводит к получению высокого фонового сигнала и некорректным результатам измерений.

В каждую лунку планшета вносят по 100 мм^3 свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора (п. 9.3.5). Общее время добавления не должно превышать 2 минут. Планшет заклеивают изолирующей пленкой или закрывают крышкой и инкубируют при (22–25) °С в темноте в течение 15 минут.

Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мм^3 стоп-реагента в той же последовательности и с той же скоростью, с которыми добавлялся хромоген-субстратный раствор. Перемешивают содержимое лунок круговым движением планшета по ровной поверхности лабораторного стола. Растворы в лунках должны окраситься в желтый цвет.

В течение не более 15 минут после остановки реакции измеряют в микропланшетном фотометре ОП растворов в лунках при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

11 Обработка результатов измерений

11.1 Расчет массовой концентрации хлорамфеникола

Программное обеспечение, поставляемое с набором – «ИФА-тест-Хлорамфеникол», разработано в Институте биоорганической химии НАН Беларуси специально для обработки результатов измерений, полученных с помощью набора «ИФА-Хлорамфеникол».

Программное обеспечение производит обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса программного обеспечения и выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B_i/B_0, % от натурального логарифма концентрации хлорамфеникола, где B_i – оптическая плотность i—го градуировочного раствора (i=C_1..C_5), B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора (C_0) с концентрацией 0,00 нг/мл хлорамфеникола, рассчитанные на основании средних значений параллельных измерений каждого раствора. Градуировка оси абсцисс в нг/см^3 соответствует концентрации антибиотика в мкг/кг или мкг/дм^3.

Расчет массовой концентрации хлорамфеникола в КПН и анализируемых пробах осуществляется по градуировочной зависимости на основании рассчитанных значений процента связывания для проб относительно градуировочного раствора C_0 как B_{xi}/B_0, %, где B_{xi} – оптическая плотность, полученная при измерении КПН или анализируемой пробы. Если измеренное значение концентрации хлорамфеникола в КПН попадает в диапазон, указанный в паспорте к набору, то ИФА выполнен правильно.

Фактическое значение массовой концентрации хлорамфеникола в пробах получают путем умножения найденной по градуировочной кривой концентрации хлорамфеникола на фактор разбавления пробы

$$X = F \cdot X', \quad (1)$$

где X – фактическое значение массовой концентрации хлорамфеникола в исследуемой пробе, мкг/кг или мкг/дм^3;

X' – концентрация хлорамфеникола в исследуемой пробе, найденная по градуировочной кривой, мкг/кг или мкг/дм^3;

F – фактор разбавления.

Для жидких молочных продуктов F=2.

Для всех остальных проб продуктов массовая концентрация хлорамфеникола определяется по градуировочной зависимости соответственно рассчитанной величине B_{Xi}/B_0, % без учета коэффициентов пересчета, так как фактор разведения составляет 1.

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

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

где X_1, X_2 – результаты измерений массовой концентрации хлорамфеникола в параллельных пробах, мкг/кг или мкг/дм^3.

Окончательный результат измерений округляют до второго знака после запятой, при этом массовую концентрацию хлорамфеникола для твердых продуктов (мышечная ткань теплокровных и рыбы, яица, мед, мороженое) выражают в мкг/кг, а для жидких молочных продуктов (йогурт, сливки, ряженка, сметана, кефир), молока сырого и восстановленных молочных продуктов – в мкг/дм^3.

11.2 Контроль холостой пробы

Для контроля чистоты реактивов и посуды проводят анализ холостой пробы. Для этого выполняют процедуру подготовки пробы, используя вместо навески или аликвоты равное количество деионизованной воды. Проводят полную подготовку пробы, включая стадии экстракции и выпаривания органического растворителя, растворения сухого остатка, как это изложено в п. 9.5.1 (мясо), п. 9.5.4 (жидкие молочные продукты), п. 9.5.5 (яйца), п. 9.5.6 (мед). Все измерения проводят согласно стандартной процедуре.

Рассчитывают (согласно п.11.1) концентрацию хлорамфеникола в

холостой пробе X_{Bl}. Если относительная оптическая плотность для таких проб B_{XBl}/B_0, %, равна или меньше величины связывания для второго градуировочного раствора C_1, то найденная концентрация хлорамфеникола находится вне диапазона градуировки и составляет менее 0,05 мкг/кг (мкг/дм^3).

При соблюдении условия:

$$X_{Bl} \leq 0{,}05 \text{ мкг/кг (мкг/дм}^3\text{)} \quad (3)$$

при последующих экспериментах с использованием данных растворителей неспецифический вклад холостого образца в расчетах концентрации хлорамфеникола в исследуемых пробах признается незначимым и в дальнейших расчетах не учитывается.

При невыполнении условия (3) найденная концентрация хлорамфеникола в холостой пробе, рассчитанная по формулам (1) и (2), вычитается из концентрации хлорамфеникола в испытуемых пробах.

Контроль холостой пробы выполняется каждый раз при замене наборов реагентов, реактивов и посуды или в соответствии с утвержденным в лаборатории планом контроля качества.

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

$$|X_1-X_2| \leq r_{abs}, \quad (4)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\overline{X}$, рассчитанное по формуле (2). Абсолютное значение предела повторяемости r_{abs}, мкг/кг (мкг/дм^3) рассчитывают по формуле

$$r_{abs} = 0{,}01 \cdot r \cdot \overline{X}, \quad (5)$$

где $\overline{X}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений параллельных проб одного образца, мкг/кг (мкг/дм^3),

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

При невыполнении условия (4) проводят повторные измерения, согласно разделу 10.

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов в виде односторонней оценки концентрации хлорамфеникола

Если конечный результат измерений оказывается меньше, чем предел обнаружения X_{LD}, равный 0,10 мкг/кг (мкг/дм^3), то дается односторонняя оценка концентрации хлорамфеникола в образце

Не обнаружено (менее X_{LD}),

где X_{LD} – значение предела обнаружений, приведенное выше.

Если конечный результат измерений оказывается больше, чем предел обнаружения X_{LD}, равный 0,10 мкг/кг (мкг/дм^3), но меньше, чем предел измерения X_{LQ}, равный 0,20 мкг/см^3 (мкг/дм^3), то дается характеристика

Обнаружено (менее X_{LQ}),

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

Если конечный результат измерений оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL}, равное:

для мышечной ткани теплокровных, молока сырого, стерилизованного или пастеризованного, восстановленных молочных продуктов, яиц, меда – 5,0 мкг/кг (мкг/дм^3);

для жидких молочных продуктов – 10 мкг/кг (мкг/дм^3) ,

то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений в мкг/кг (мкг/дм^3)

Более X_{HL},

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

12.2 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Форма предоставления результатов описывается в Руководстве по качеству конкретной лаборатории пользователя набора.

Если конечный результат измерений оказывается больше, чем предел измерения X_{LQ}, равный 0,20 мкг/кг (мкг/дм^3), то результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$\bar{X} \pm U(X), \text{ мкг/кг (мкг/дм}^3\text{)}$$

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

где $\bar{X}$ – результат измерений, мкг/кг (мкг/дм^3), полученный в соответствии с настоящей методикой,

$U(X)$ – расширенная неопределенность результатов измерений, мкг/кг (мкг/ дм^3).

Расширенную неопределенность, мкг/кг (мкг/дм^3), результатов измерений рассчитывают по формуле

$$U(X)=0{,}01 \cdot U \cdot \bar{X}, \qquad (6)$$

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

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

13 Контроль точности результатов измерений

Контроль точности 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 МВИ.

13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации хлорамфеникола 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 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 (мкг/дм^3), результатов измерений двух лабораторий $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$, соответственно

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2} \qquad (7)$$

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

$$|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \le CD_{abs}, \qquad (8)$$

то оба конечных результата, полученных в двух лабораториях, считаются приемлемыми и общее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (7), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности CD_{abs}, мкг/кг (мкг/дм^3), рассчитывают по формуле

$$CD_{abs} = 0{,}01 \cdot CD \cdot \overline{\overline{X}}, \qquad (9)$$

где $\overline{\overline{X}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений двух лабораторий, мкг/кг (мкг/дм^3);

CD – относительное значение критической разности, %, рассчитанное по формуле

$$CD = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}, \qquad (10)$$

где r – относительное значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 3 ;

R – относительное значение предела воспроизводимости, %, указанное 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.

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

Диапазон измерений, мкг/кг (мкг/дм^3)	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %	Норматив контроля правильности, $K_{отн}$, %
от 0,20 до 5,00 включ. от 0,20 до 10,00 включ. (для жидких молочных продуктов)	26	30	17

13.3 Контроль правильности

Контроль правильности осуществляют с периодичностью, установленной системой менеджмента качества в лаборатории, но обязательно:

– при внедрении методики;

– при значимых изменениях в условиях измерений (новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.).

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

13.3.1ОК, представляющие собой пробы с добавкой

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

$$X_{sp} = \frac{C_{st} \cdot V_{st}}{m}, \qquad (11)$$

где C_{st} – концентрация хлорамфеникола в стандартном растворе, нг/см^3;

V_{st} – объем стандартного раствора хлорамфеникола, см^3;

m – масса навески пробы, г или объем, см^3.

Величина концентрации хлорамфеникола в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений, в средней части градуировочной кривой B_i/B_0 = 50±10 %, что соответствует примерно 0,30 мкг/кг или мкг/дм^3. Для внесения добавки используется стандартный раствор хлорамфеникола с концентрацией 10 нг/см^3, поставляемый в составе набора.

13.3.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений ОК в соответствии с требованиями раздела 10. За результат контрольного измерения принимают результат измерения концентрации хлорамфеникола $\bar{X}_K$ в ОК, мкг/кг (мкг/дм^3), рассчитанный по формуле (2), при выполнении условия повторяемости по п.11.3.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_K - X_{sp}| \le 0{,}01 \cdot K_{отн} \cdot \bar{X}_K, \qquad (12)$$

где $\bar{X}_K$ – рассчитанная по градуировочной кривой концентрация хлорамфеникола в ОК, мкг/кг (мкг/дм^3);

X_{sp} – концентрация хлорамфеникола в пробе с внесенной добавкой, рассчитанная по формуле (11);

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

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (12) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.4 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 [4] и СТБ ИСО 5725-6, 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.

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

Для построения и ведения Recovery-карт используются образцы, представляющие собой рабочие пробы с добавками стандартного раствора. Предварительно установленная концентрация хлорамфеникола в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку хлорамфеникола в образцы для контроля на уровне 0,3 мкг/кг (мкг/дм^3) с использованием стандартного раствора хлорамфеникола, поставляемого в составе набора.

13.4.1 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

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1{,}128 \cdot \sigma_r, \qquad (13)$$

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^{\dagger} \cdot \sigma_r = 2{,}834 \cdot \sigma_r \qquad (14)$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3{,}686 \cdot \sigma_r \qquad (15)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной школе 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 (16), оформлении Листа данных КК и нанесении данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \qquad (16)$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [4], п.7.

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формулам (16), (17)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^{N} W_i / N}{d_2}, \qquad (17)$$

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

d_2 – коэффициент, $d_2 = 1{,}128$.

13.4.2 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

$$\overline{\mathrm{Re}c} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Re}c_i}{N}, \qquad (18)$$

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 хлорамфеникола, по формуле

$$\mathrm{Re}c_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \qquad (19)$$

где X_i – концентрация хлорамфеникола в пробе с добавкой, полученная для i-го измерения, мкг/кг (мкг/см^3);

X_{exp} – рассчитанное значение концентрации хлорамфеникола в пробе с добавкой, мкг/кг (мкг/см^3).

• Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 2 \cdot S_{\mathrm{Re}c} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 2 \cdot S_{\mathrm{Re}c} \qquad (20)$$

• Границы регулирования

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 3 \cdot S_{\mathrm{Re}c} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 3 \cdot S_{\mathrm{Re}c}, \qquad (21)$$

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

$$S_{\mathrm{Re}c} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left(\overline{\mathrm{Re}c} - \mathrm{Re}c_i\right)^2}{N-1} \qquad (22)$$

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 извлечения $\mathrm{Re}c_i$ по формуле (19), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [4] , 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 4174-77 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4207-75 Реактивы. Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 9293-74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 22300-76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29245-91 Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей

СТБ 1036-97 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности

СТБ ИСО 5725-2-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

СТБ ИСО 5725-4-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений

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

15 Библиография

[1] ТУ BY 100185129.119-2012 Набор реагентов для определения хлорамфеникола в сырье и продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа «ИФА-Хлорамфеникол»

[2] ISO 21748:2010 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и точности при оценивании неопределенности измерения. Перевод с английского

[3] ТУ 6-09-3375-78 н-Гексан

[4] ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта

gost.e-ecolog.ru