СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке БелГИМ

_____ Т.А. Коломиец

«13» 02 2015

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Компания Альгимед»

_____ В.В. Лютынский

«16» 02 2015

Определение содержания левомицетина (хлорамфеникола) в молоке, сухом молоке, мясе и меде методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов MaxSignal® Chloramphenicol (CAP) ELISA Test Kit и ИФАантибиотик-хлорамфеникол

МВИ.МН 4230-2015

(взамен МВИ.МН 4230-2013)

МИНСК 2015

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения **3**
2 Показатели точности **3**
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы **4**
4 Метод измерений **6**
5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов **7**
5.1 Требования безопасности 7
5.2 Требования к квалификации операторов 7
6 Условия выполнения измерений **7**
7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении **7**
8 Условия хранения набора реагентов **8**
9 Подготовка к выполнению измерений **8**
9.1 Отбор образцов 8
9.2 Подготовка лабораторной посуды 8
9.3 Приготовление растворов 8
9.4 Подготовка проб 9
9.5 Подготовка набора реагентов 12
9.6 Подготовка микротитровального планшета 13
10 Проведение 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 Расчет массовой концентрации хлорамфеникола 15
11.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости 16
11.3 Контроль холостой пробы мяса и меда 17
12 Оформление результатов измерений **17**
12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности 17
12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием предела измерения 17
12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием значения верхней границы диапазона измерений 18
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 20
13.4 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 21
14 Нормативные ссылки **23**
15 Библиография **24**

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

1 Область применения

Настоящая методика распространяется на молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, мясо и мед и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания левомицетина (хлорамфеникола).

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации хлорамфеникола с использованием набора реагентов MaxSignal ® для определения хлорамфеникола, каталожный номер 1013-05B (MaxSignal® Chloramphenicol (CAP) ELISA Test Kit, Reference # 1013-05B) производства BIOO Scientific Corporation (США), или набора реагентов ИФАантибиотик-хлорамфеникол, производства ООО «Кампания Альгимед» (Республика Беларусь), далее набор реагентов.

Диапазон измерений методики составляет:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного – от 0,030 до 1,875 мкг/кг;
- для молока сухого от 0,030 до 1,875 мкг/кг*;
- для мяса – от 0,015 до 0,750 мкг/кг;
- для меда – от 0,030 до 1,500 мкг/кг.

Предел измерения для данной методики составляет:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного – 0,030 мкг/кг;
- для молока сухого – 0,030 мкг/кг;
- для мяса – 0,015 мкг/кг;
- для меда – 0,030 мкг/кг.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Показатели точности

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

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и воспроизводимости

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение воспроизводимости σ_R, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	от 0,030 до 1,875 включ.	6,8	8,4
Молоко сухое	от 0,030 до 1,875 включ.	7,5	9,1
Мясо	от 0,015 до 0,750 включ.	6,3	7,5
Мед	от 0,030 до 1,500 включ.	5,0	7,7

* Здесь и далее по тексту результат измерений массовой концентрации хлорамфеникола в сухом молоке относится к восстановленному согласно данной методике продукту

Значения оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности, полученные с учетом обнаруживаемого смещения, приведены в таблице 2.

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

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K=2, P=95$ %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	от 0,030 до 1,875 включ.	8	16
Молоко сухое	от 0,030 до 1,875 включ.	9	18
Мясо	от 0,015 до 0,750 включ.	9	18
Мед	от 0,030 до 1,500 включ.	9	18

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 [1], [2].

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

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

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %), например EMax Plus, производства Molecular Devices LLC, 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 относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (пробирки вместимостью 15 см^3), например Rotofix 32A, производства Hettich Lab Technology Aps, Германия.

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, например термошейкер PST-60HL, производства BioSan Ltd, Латвия.

Гомогенизатор лабораторный типа ULTRA-TURRAX производства IKA® Werke GmbH & Co. KG (Германия), например Ultra Turrax DI 25 Digital или бытовой блендер.

Роторный испаритель в комплекте с водяной баней, обеспечивающей поддержание температуры 60 °С с точностью ± 5 °С, например Hei-VAP Value/G1,

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

производства Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Германия.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры 60 °С, 80 °С с точностью ± 5 °, например WB-4MS производства BioSan Ltd, Латвия.

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

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

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

- Инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью не более ± 1 °С, например Thermomixer comfort производства Eppendorf AG, Германия в комплекте с термоблоком для микротитровальных планшетов.
- Устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету от 100 мм^3 до 350 мм3, например 3D-IW8, производства BioSan Ltd, Латвия.

Пробирки для центрифугирования из полипропилена вместимостью 15 см^3.

Пробирки для центрифугирования из стекла или полистирола вместимостью 10 см^3 или 15 см^3. Допускается использовать пробирки для центрифугирования из полипропилена.

Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 1,5 – 2,2 см^3.

Пробирки для центрифугирования из стекла вместимостью 10 см^3 или 15 см^3. Допускается использовать пробирки для центрифугирования из полипропилена.

Пробирки стеклянные вместимостью:

- 4 см^3 или 5 см^3 типа П-1-5-0,1 ХС по ГОСТ 1770.
- 10 см^3, П-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770;

Колбы мерные 2 – 100 – 2 или 3 – 100 – 2 по ГОСТ 1770.

Колбы Кн-1-100-14/23, Кн-1-250-24/29, Кн-1-500-29/32, Кн-1-1000-45/40 по ГОСТ 25336.

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

Пипетки 1-2-20, 1-2-25 по ГОСТ 29169.

Пипетки 1-1-1-5, 1-1-1-10 по ГОСТ 29227.

Цилиндры мерные 2-25-1, 2 – 50 – 1, 2 – 250 – 1 по ГОСТ 1770.

Пленка «парафильм» или

Бумага фильтровальная

Шпатели пластиковые

Штатив для пробиро

Компания Альгимед г.Минск для документов

Пипетки Пастера.

Микрофибровые салфетки, например Ultrafine 30x30, производства Marumi Optical Co. Ltd.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода деионизированная.

Лабораторный детергент.

Азот газообразный повышенной чистоты 1 сорт по ГОСТ 9293.

Этилацетат ч.д.а. по ГОСТ 22300.

Н-гексан ч.д.а. по [3].

Ацетонитрил с массовой долей основного вещества 99,9 %, например ацетонитрил х.ч. по [5].

Хлорамфеникол с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Набор реагентов MaxSignal ® для определения хлорамфеникола, каталожный номер 1013-05B (MaxSignal® Chloramphenicol (CAP) ELISA Test Kit, Reference # 1013-02B) производства BIOO Scientific Corporation (США) или ИФАантибиотик-хлорамфеникол, производства ООО «Кампания Альгимед» (Республика Беларусь), состоящие из реактивов и микротитровального планшета, необходимых для выполнения измерений по определению содержания хлорамфеникола методом иммуноферментного анализа. Состав наборов реагентов приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав набора реагентов

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к хлорамфениколу)	1 шт
Градуировочные растворы хлорамфеникола с концентрацией 0 нг/см^3, 0,015 нг/см^3, 0,030 нг/см^3, 0,150 нг/см^3, 0,500 нг/см^3, 1,500 нг/см^3	6 шт × 1,8 см^3
Конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена	8,0 см^3
10× концентрат экстракционного буфера для образцов	25 см^3
20× концентрат промывочного раствора	28 см^3
Стоп-реагент	20 см^3
ТМБ субстрат	12 см^3
Экстракционный буфер А	20 см^3
Экстракционный буфер В	20 см^3
Буфер для доведения проб	6 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:

- 10× концентрат экстракционного буфера для образцов;
- 20× концентрат промывочного раствора;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

4 Метод измерений

Используемый метод основан на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антителами к хлорамфениколу, вместе с раствором пробы или градуировочным раствором добавляют конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена.

Присутствующий в пробе хлорамфеникол конкурирует с конъюгированным пероксидазой хлорамфениколом за связывание с антителами на стенках лунки. Интенсивность окраски, образующейся после добавления ТМБ субстрата, обратно пропорциональна концентрации хлорамфеникола в растворе. Оптическая плотность

КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г.МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

растворов измеряется при 450 нм.

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

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Требования безопасности

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

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

5.2 Требования к квалификации операторов

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

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- температура при приготовлении растворов (20 ± 2) ^{0}С;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °С.

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 ^{0}С до плюс 25 ^{0}С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев [illegible] 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.

КОМПАНИЯ АЛЬГИМЕД г. МИНСК ДЛЯ ДОКУМЕНТОВ

- 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. Если набор реагентов не планируется использовать более трех месяцев, то конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена рекомендуется хранить при температуре минус 20 °С.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

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

9.2 Подготовка лабораторной посуды

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

Запрещается:

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

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Экстракционный буфер для образцов

Аликвоту 10×концентрата экстракционного буфера для образцов, отмеренную дозатором или пипеткой, переносят в коническую колбу вместимостью 100 см^3 или 250 см^3 в зависимости от объема аликвоты, добавляют в 9 раз больший объем дистиллированной воды, отмеренный цилиндром, и перемешивают. Объем аликвоты концентрата, необходимый для приготовления экстракционного буфера для анализа N_{smp} образцов, составляет

- мясо – $0{,}2 \cdot N_{smp}$ см^3;
- мед – $0{,}1 \cdot N_{smp}$ см^3.

Раствор используют свежеприготовленным.

9.3.2 Приготовление моющего раствора

Аликвоту 20×концентрата моющего раствора, отмеренную мерным цилиндром, переносят в коническую колбу вместимостью 500 см^3 или 1000 см^3, приливают отмеренную мерным цилиндром дистиллированную воду, объем которой в 19 раз больше объема аликвоты концентрата, и перемешивают. Объем аликвоты концентрата выбирается в зависимости от предполагаемого количества анализируемых образцов и

составляет от 10 см^3 до 28 см^3. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 1 месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.4 Подготовка проб

9.4.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

9.4.1.1 Получение обезжиренного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с разделом 9.1. Доводят температуру представленного образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая молоко при комнатной температуре. Перед взятием аликвоты испытуемый образец тщательно перемешивают на вортексе. От образца молока с помощью пипетки или дозатора отбирают две параллельные пробы объемом по 10 см^3 и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. Центрифугируют пробы в следующем режиме: 20 °С –25 °С, 4000 g, 5 мин.

Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования.

9.4.1.2 Получение растворов проб молока

Аликвоты обезжиренного молока, полученные по п. 9.4.1.1, объемом 1 см^3, отобранные дозатором из каждой пробы, переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 см^3 (перед тем, как вылить молоко в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления возможных следов жира). Затем в пробирки добавляют 50 мм^3 экстракционного буфера А, встряхивают 5 сек, сразу же добавляют 50 мм^3 экстракционного буфера В, и перемешивают содержимое пробирки на вортексе на максимальной скорости в течение 30 сек.

Пробирки центрифугируют в одном из двух режимов:

- 20 °С –25 °С, 4000 g, 10 мин;
- 20 °С –25 °С, 10000 g, 2 мин.

Дозатором переносят 440 мм^3 надосадочной жидкости в новые пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 см^3, добавляют в пробирки 60 мм^3 буфера для доведения проб, и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

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

9.4.2 Подготовка проб сухого молока

9.4.2.1 Получение обезжиренного 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.

В мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 2 параллельные навески образца сухого молока, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г. Массы навесок в зависимости от содержания жира составляют:

Компания Альгимед для документов г. Минск

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %.

Затем приливают небольшими порциями по 10 – 20 $см^3$ дистиллированную воду, нагретую до температуры 40 °С, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения сухого молока.

Раствор охлаждают до температуры от плюс 18 °С до плюс 22 °С и доводят до метки дистиллированной водой.

В две пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ отбирают отмеренные дозатором аликвоты растворенного сухого молока объемом 10 $см^3$.

Пробирки центрифугируют в следующем режиме: 20 °С –25 °С, 4000 g, 20 мин.

Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования.

Для сухого обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

9.4.2.2 Получение растворов проб сухого молока

Аликвоты обезжиренного молока, полученные по п. 9.4.2.1, объемом 1 $см^3$, отобранные дозатором из каждой пробы, переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 $см^3$ (перед тем, как вылить молоко в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления возможных следов жира). Затем в пробирки добавляют 50 $мм^3$ экстракционного буфера А, встряхивают 5 сек, сразу же добавляют 50 $мм^3$ экстракционного буфера В, и перемешивают содержимое пробирки на вортексе на максимальной скорости в течение 30 сек.

Пробирки центрифугируют в одном из двух режимов:

- 20 °С –25 °С, 4000 g, 10 мин;
- 20 °С –25 °С, 10000 g, 2 мин.

Дозатором переносят 440 $мм^3$ надосадочной жидкости в новые пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 $см^3$, добавляют в пробирки 60 $мм^3$ буфера для доведения проб, и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

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

9.4.3 Подготовка проб мяса

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

От гомогенизированного образца мяса отбирают две параллельные навески массой 3,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 6 $см^3$ этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно встряхивают несколько раз, после чего дополнительно перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин.

Затем пробирки центрифугируют при 20 – 25 °С, 4000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную

Копия Альгимед г. Минск для документов

жидкость объемом 4 $см^3$, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 4 $см^3$ или 5 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 2 $см^3$, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 9.3.1 объемом 1 $см^3$ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$.

Пробирки центрифугируют при 20 – 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой. Если после центрифугирования образуется эмульсия, то дозатором удаляют максимально возможный объем верхнего органического слоя, выдерживают пробирки на водяной бане при температуре 80 °С в течение 3 мин, затем охлаждают до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С и центрифугируют при 20 – 25 °С, 4000 g, 10 мин, после чего удаляют дозатором оставшийся верхний органический слой.

Водные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.4.4 Подготовка холостой пробы мяса

В две стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$ приливают отмеренные пипеткой или дозатором 4 $см^3$ этилацетата.

Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

В пробирки добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 2 $см^3$, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 9.3.1, объемом 1 $см^3$ и перемещивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$.

Пробирки центрифугируют при 20 – 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин. После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой. Если после центрифугирования образуется эмульсия, то дозатором удаляют максимально возможный объем верхнего органического слоя, выдерживают пробирки на водяной бане при температуре 80 °С в течение 3 мин, затем охлаждают до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С и центрифугируют при 20 – 25 °С, 4000 g, в течение 10 мин, после чего удаляют дозатором оставшийся верхний органический слой.

Водные растворы проб используют для проведения ИФА. Полученные растворы используют для проведения ИФА при контроле холостой пробы с периодичностью согласно п. 11.3. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.4.5 Подготовка проб меда

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с разделом 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая

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

его при комнатной температуре. От образца меда отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с погрешностью 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки для центрифугирования с закручивающимися крышками вместимостью 10 $см^3$ или 15 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью пипстки или дозатора 1 $см^3$ экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 9.3.1. Пробирки встряхивают до полного растворения меда, после чего добавляют отмеренные с помощью пипетки или дозатора 4 $см^3$ ацетонитрила. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 3 мин на максимальной скорости.

Примечание: допускается использовать пробирки для центрифугирования из полипропилена.

Пробирки центрифугируют при 20 – 25 °С, 4000 g, в течение 3 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 1 $см^3$, и помещают ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$.

Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 9.3.1 объемом 0,5 $см^3$ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости.

Подготовленные таким образом пробы используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часа.

9.4.6 Подготовка холостой пробы меда

В две стеклянные пробирки вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$ приливают отмеренные пипеткой или дозатором 1 $см^3$ ацетонитрила.

Выпаривают ацетонитрил из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре от плюс 60 °С до плюс 70 °С до отсутствия запаха ацетонитрила.

В пробирки добавляют отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 9.3.1 объемом 0,5 $см^3$ и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на скорости 1000 – 1500 об/мин.

Полученные растворы используют для проведения ИФА при контроле холостой пробы с периодичностью согласно п. 11.3. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение двух часов.

9.5 Подготовка набора реагентов

9.5.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдержнвают 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.

Перед использованием жидкие компоненты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать

г.МИНСК

обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемых при проведении измерений в соответствии с п. 10.

9.6 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 12 + 2N_{SMP}, \qquad (1)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные соответствии с п. 9.5.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w. Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 8.

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.

10 Проведение измерений

10.1 Общие требования

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

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.9.6, вносят дозатором по 100 мм^3 каждого градуировочного раствора в две параллельные лунки. Внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00; 0,015; 0,030 0,150; 0,500; 1,500 нг/см^3). В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят дозатором по 100 мм^3 растворов каждой параллельной пробы анализируемых образцов.

10.2.2 Добавление раствора коньюгата

Во все лунки микротитровального планшета добавляют по 50 мм^3 раствора коньюгата. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола [illegible]

10.2.3 Инкубация планшета

Сразу после перемешивания помещают планшет в инкубатор при температуре

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

от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 60 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 60 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета.

10.2.4 Промывка планшета

Промывают планшет 3 раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 моющего раствора, приготовленного по п. 9.3.2, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Допускается 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 ТМВ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм^3 ТМВ-субстрата, после чего сразу же засекают время начала инкубации. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

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

10.2.6 Повторная инкубация

Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 20 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в помещении в защищенном от света месте при соблюдении условий, указанных в разделе 7. По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении).

10.2.7 Завершение реакции окрашивания

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

10.2.8 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.

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

11 Обработка результатов измерения

11.1 Расчет массовой концентрации хлорамфеникола

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 хлорамфеникола вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \qquad (2)$$

где B – оптическая плотность раствора;

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

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

a, b – коэффициенты линейной регрессии.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК на основании пар значений B_i/B_0 и $\ln C_i$, 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.

Для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного и сухого во всех случаях, а для мяса и меда в случае, если в результате проведения контроля холостой пробы согласно п. 11.3 условие (8) выполняется, концентрация хлорамфеникола в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right), \qquad (3)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, имеющий следующие значения:

- молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное – 1,25;
- молоко сухое – 1,25;
- мясо – 0,5;
- мед – 1.

Если в результате проведения контроля холостой пробы мяса и меда согласно п. 11.3, условие (8) не выполняется, то вместо формулы (3) для расчета концентрации хлорамфеникола в пробе применяется следующая формула

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right) - X_{BL}, \qquad (4)$$

где X_{BL} – концентрация [illegible] в холостой пробе, мкг/кг, определяемая согласно раздела 11.3.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое

Компания Аметист для документов г. Минск

значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.2

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (5)$$

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

Окончательный результат измерений округляют до третьего десятичного знака после запятой.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ}, равный

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного – 0,030 мкг/кг;
- для молока сухого – 0,030 мкг/кг;
- для мяса – 0,015 мкг/кг;
- для меда – 0,030 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием предела измерения согласно п. 12.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, равное:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного –1,875 мкг/кг;
- для молока сухого – 1,875 мкг/кг;
- для мяса – 0,750 мкг/кг;
- для меда – 1,500 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 12.3.

11.2 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

$$|X_1 - X_2| \le r_{abs}, \quad (6)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (5).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (7)$$

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

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

При невыполнении условия (6) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

ООО "КОМПАНИЯ ДАЛЬГИМЕД" г. Минск для документов

11.3 Контроль холостой пробы мяса и меда

Для контроля чистоты реактивов и посуды проводят анализ холостой пробы мяса и меда.

Для этого выполняют процедуру подготовки холостой пробы согласно п. 9.4.4 (мясо). п. 9.4.6 (мед). Рассчитывают массовую концентрацию хлорамфеникола в холостой пробе X_{BL}, мкг/кг по формулам (3), (5) (п. 11.1).

Если полученное значение массовой концентрации хлорамфеникола в холостой пробе мяса и меда удовлетворяет условию

$$X_{BL} \le X_L, \tag{8}$$

где X_L – значение концентрации хлорамфеникола в пробе, составляющее 0,015 мкг/кг для мяса и 0,030 мкг/кг для меда, то массовую концентрацию хлорамфеникола в холостой пробе при расчете результатов анализа проб мяса и меда не учитывают (расчет ведется по формуле (3)).

При невыполнении условия (8) массовая концентрация хлорамфеникола в холостой пробе при расчете результатов анализа проб мяса и/или меда учитывается (расчет массовой концентрации хлорамфеникола в пробах мяса и меда ведется по формуле (4)).

Контроль холостой пробы выполняется каждый раз при замене набора реагентов, реактивов и посуды.

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

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

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

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

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

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

$$U(X) = 0{,}01 \cdot U \cdot \bar{X}, \tag{9}$$

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.

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

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел

Компания Альгимед г.Минск для документов

измерения X_{LQ}, равный:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного – 0.030 мкг/кг;
- для молока сухого – 0,030 мкг/кг;
- для мяса – 0,015 мкг/кг;
- для меда – 0,030 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола 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 хлорамфеникола с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL}, равное:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного – 1,875 мкг/кг;
- для молока сухого– 1,875 мкг/кг;
- для мяса – 0,750 мкг/кг;
- для меда – 1,500 мкг/кг,

то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола 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 хлорамфеникола при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 11.2.

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:

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

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.2.

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

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2} \quad (10)$$

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

$$|\overline{X}_1 - \overline{X}_2| \leq \mathrm{CD}_{abs}, \quad (11)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (10) может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности CD_{abs}, мкг/кг, рассчитывают по формуле

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

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

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

$$CD = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}, \quad (13)$$

где r – относительное значение предела повторяемости, %, приведенное в таблице 4;

R – относительное значение предела воспроизводимости, %, 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, воспроизводимости и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Предел воспроизводимости R, %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное	19	24	14
Молоко сухое		25	14
Мясо		21	14
Мед		22	14

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

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 значением концентрации вещества (рабочая проба с добавкой).

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

13.3.1 ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавкой

ОК представляют собой навески проб с массовой концентрацией хлорамфеникола менее предела измерения с добавкой раствора хлорамфеникола. ОК готовятся путем внесения раствора хлорамфеникола непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации хлорамфеникола X_{RF} в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

$$X_{RF} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \tag{14}$$

где C_{ST} – концентрация раствора хлорамфеникола, мкг/дм^3;

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

m – масса навески пробы, г.

Примечание: принимается, что для сырого, пастеризованного, стерилизованного и растворенного сухого молока масса m численно равна объему пробы молока, см^3.

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

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из хлорамфеникола в соответствии с рекомендациями производителя. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы) хлорамфеникола, при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации хлорамфеникола в них не превышает 3 %.

13.3.2 Проведение контрольной процедуры

Получают серию из шести результатов измерений ОК в условиях повторяемости в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой концентрации хлорамфеникола $\overline{X_K}$ в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле

$$\overline{X_K} = \frac{\sum_{i=1}^{6} X_i}{6}, \tag{15}$$

где X_i - i-ый результат измерений ОК, мкг/кг.

Проводят контроль повторяемости по п. 11.2, используя вместо относительного предела повторяемости r, приведенного в таблице 4, значение $1{,}43 \cdot r$.

Критерием приемлемости является условие

$$|X_K - X_{ст}| \le 0{,}01 \cdot X_{ст} \cdot X_{ат}, \tag{16}$$

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

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

$X_{ан}$ – установленное значение массовой концентрации хлорамфеникола в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (16) 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.

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 стандартного раствора. Предварительно установленная массовая концентрация хлорамфеникола в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения, декларируемого производителем набора реагентов. Рекомендуется вносить добавку хлорамфеникола в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

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

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1{,}128 \cdot \sigma_r, \qquad (17)$$

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2{,}834 \cdot \sigma_r \qquad (18)$$

- Границы регулирования

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

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r \qquad (19)$$

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

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \qquad (20)$$

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 (20), (21)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^{N} W_i / N}{d_2}, \qquad (21)$$

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.

13.4.2 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

$$\overline{\mathrm{Rec}} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Rec}_i}{N}, \qquad (22)$$

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

Rec_i – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i–го измерения пробы с добавкой хлорамфеникола, по формуле

$$\mathrm{Rec}_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \qquad (23)$$

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

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

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{\mathrm{Rec}} + 2 \cdot S_{REC} \qquad LCL = \overline{\mathrm{Rec}} - 2 \cdot S_{REC} \qquad (24)$$

- Границы регулирования

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

$$UCL = \overline{\mathrm{Re}c} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{\mathrm{Re}c} - 3 \cdot S_{REC} \tag{25}$$

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

$$S_{REC} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \left(\overline{\mathrm{Re}c} - \mathrm{Re}c_i\right)^2}{N-1}, \tag{26}$$

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 (23), 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 6709–72	Вода дистиллированная. 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 Е	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ГОСТ 29245-91	Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей.

Компания Альгимед г.Минск для документов

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 измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-4-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4 Основные методы определения правильности стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике

15 Библиография

[1]	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, воспронзводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения *Перевод с английского*
[2]	«Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation», EUROLAB technical report No. 1/2007, March 2007	«Пересмотр неопределенности измерений: Альтернативные подходы к оценке неопределенности», Технический отчет ЕВРОЛАБ №1/2007, Март 2007 *Перевод с английского*
[3]	ТУ 2631-003-05807999-98 Реактивы. Н-гексан	
[4]	ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта	
[5]	ТУ 2636-092-44493179-04 Ацетонитрил (нитрил уксусной кислоты, метилцианид)	

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

gost.e-ecolog.ru