СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке
БелГИМ

Т.А. Коломиец

09 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ

Управляющий
ОДО «КомПродСервис»

Д.Ч. Кучинский

«14» 09 2015 г.

Методика выполнения измерений содержания антибиотиков группы пенициллинов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием тест-систем производства EuroProxima B.V., Нидерланды

МВИ.МН 5336 - 2015

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 893 / 2015
об аттестации МВИ от 16.09.2015 г.

МИНСК 2015

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения **3**
2 Точность измерений **3**
3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы **5**
3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы 5
3.2 Реактивы 6
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 тест-систем **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 8
9.5 Подготовка тест-систем 11
9.6 Приготовление раствора конъюгата 13
9.7 Приготовление раствора антител 13
9.8 Приготовление градуировочных растворов 14
10 Выполнение измерений **14**
11 Обработка результатов измерений **16**
12 Контроль бланка **17**
13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости **18**
14 Оформление результатов измерений **18**
14.1 Форма представления результата измерения с использованием расширенной неопределенности 18
14.2 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием предела измерения 18
14.3 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием значения верхней границы диапазона измерений 19
15 Контроль точности результатов измерений **19**
15.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости. 19
15.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности 19
15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости 20
15.4 Контроль правильности 21
15.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК) 22
16 Нормативные ссылки **24**
Библиография **25**

1 Область применения

Настоящая методика распространяется на сырое, пастеризованное, стерилизованное, сухое восстановленное и сгущенное молоко, молочную сыворотку, восстановленную сухую молочную сыворотку, творог, коктейли молочные, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, мороженое на молочной основе, мясо (мышцы) и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания антибиотиков группы пенициллинов (бензилпенициллина, ампициллина, амоксициллина, оксациллина, пиперациллина).

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации антибиотиков группы пенициллинов[1] с использованием тест-систем PENICILLIN ELISA производства EuroProxima B.V., Нидерланды.

Диапазон измерений методики составляет:

- для мяса, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, творога, сыра, коктейлей молочных, кисломолочных продуктов, мороженого на молочной основе – от 2,5 мкг/кг до 160,0 мкг/кг;
- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого восстановленного– от 0,16 мкг/кг до 8,00 мкг/кг.
- для сгущенного молока – от 1,00 мкг/кг до 32,00 мкг/кг.

Предел измерений для данной методики составляет:

- для мяса, молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, творога, сыра, коктейлей молочных, кисломолочных продуктов, мороженого на молочной основе – 2,5 мкг/кг;
- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого восстановленного– 0,16 мкг/кг.
- для сгущенного молока –1,00 мкг/кг.

2 Точность измерений

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

[1] Массовая концентрация антибиотиков группы пенициллинов в соответствии с данной методикой определяется как сумма массовых концентраций бензилпенициллина, ампициллина, амоксициллина, оксациллина, пиперациллина в пересчете на бензилпенициллин с учетом перекрестной чувствительности, специфицируемой производителем для вышеуказанной тест-системы

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(IV)}$, %
Мясо	от 2,5 до 160,0 включ.	5,7	6.0
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молоко сухое восстановленное	от 0,16 до 8,00 включ.	4,3	6,6
Молоко сгущенное	от 1,00 до 32,00 включ.	4,3	6,6
Творог, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, коктейли молочные, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженое на молочной основе	от 2,5 до 160,0 включ.		7,2

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

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

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

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

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

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность u_c, %	Относительная расширенная неопределенность U, %, $K = 2, P = 95$ %
Мясо	от 2,5 до 160,0 включ.	7	14
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молоко сухое восстановленное	от 0,16 до 8,00 включ.	8	16
Молоко сгущенное	от 1,00 до 32;00 включ.	8	16
Творог, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, коктейли молочные, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженое на молочной основе	от 2,5 до 160,0 включ.	9	

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

3.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания не менее 200 г, погрешностью ± 0,01 г.

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

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

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 2000 g при использовании ротора для пробирок вместимостью 15 $см^3$.

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

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

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

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

Дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников:

- с диапазоном объемов дозирования от 20 $мм^3$ до 200 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 2,0 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 $мм^3$ до 1000 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 $см^3$ до 5 $см^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,0 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 2 $см^3$ до 10 $см^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального ± 1,0 %;
- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 50 $мм^3$ до 350 $мм^3$ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более ± 4,6 % (при отсутствии автоматического устройства для отмывки иммунологических планшетов).

Пленка «парафильм» или скотч.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Штатив для пробирок.

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

Пробирки стеклянные вместимостью 5 $см^3$ или 10 $см^3$ по ГОСТ 1770.

Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 2 $см^3$.

Колбы мерные вместимостью 100 $см^3$ типа 2–100–2 по ГОСТ 1770.

Колбы конические вместимостью 100 $см^3$, 500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

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

Стаканы Н-1-100 или Н-1-150, Н-1-500 по ГОСТ 25336.

Пипетки 1-2-5 по ГОСТ 29169.

Палочки стеклянные оплавленные.

Цилиндры мерные вместимостью 25 $см^3$, 50 $см^3$, 250 $см^3$, 500 $см^3$ типа 3–25–2, 3–50–2, 3–250–2, 3–500–2 по ГОСТ 1770.

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

• инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температур от 20 °С до 25 °С с точностью ± 1 °С;

• устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету от 100 мм^3 до 350 мм^3.

3.2 Реактивы

Дихлорметан х.ч. по по [3].

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Пенициллина G (бензилпенициллина) калиевая соль с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизированная.

Тест-система PENICILLIN ELISA производства EuroProxima B.V., Нидерланды, каталожный номер 5091PEN, в составе (таблица 3).

Таблица 3 – Состав тест-системы PENICILLIN ELISA

Компонент тест-систем	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых первичными антителами)	1 шт
100×концентрат конъюгата	100 мм^3
100×концентрат раствора антител	100 мм^3
Раствор субстрата (готовый к применению)	1 шт. × 12 см^3
Стоп-реагент (готовый к применению)	1 шт. × 15 см^3
4×концентрат буфера для разбавления	1 шт. × 20 см^3
20×концентрат моющего буфера	1 шт. × 30 см^3
Лиофилизированный стандарт с концентрацией 4 пг/см^3 в восстановленном стандарте	3 шт.

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

4 Метод измерений

В лунки микротитровального планшета добавляются градуировочные растворы или растворы проб вместе с антителами и конъюгатом, представляющим собой ампициллин, маркированный пероксидазой хрена. Присутствующие в пробе антибиотики группы пенициллинов и конъюгированный ампициллин конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА). После 60-минутной инкубации несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки.

После добавления раствора субстрата/хромогена (перекись водорода /тетраметилбензидин) связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт.

Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм.

Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации ампициллина в градуировочном растворе и антибиотиков группы пенициллинов в растворе пробы. Массовая концентрация антибиотиков группы пенициллинов в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 7 градуировочных растворов.

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Требования безопасности

При выполнении работ в соответствии с данной методикой персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

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

5.2 Требования к квалификации операторов

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

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

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

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

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

8 Условия хранения тест-систем

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

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

Необходимо исключить прямое попадание света на раствор субстрата.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение суток 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 2 °С до 8 °С.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

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

Запрещается:

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

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление буфера для разбавления

4×концентрат буфера для разбавления подготавливают по п. 9.5.1. В коническую колбу вместимостью 100 см^3 вносят дозатором аликвоту 4×концентрата буфера для разбавления проб и добавляют цилиндром в 3 раз больший объем дистиллированной воды, после чего содержимое колбы перемешивают.

Полученный раствор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение месяца.

9.4 Подготовка проб

9.4.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

9.4.1.1 Предварительная подготовка проб

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая молоко при комнатной температуре. Перед взятием аликвоты испытуемый образец перемешивают путем встряхивания и переворачивания представленной упаковки.

9.4.1.2 Получение подготовленных проб молока

Отбирают дозатором две параллельные аликвоты проб молока, объемом 250 мм^3 и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см^3. К пробам в пробирках добавляют отобранные дозатором 250 мм^3 буфера для разбавления, приготовленного по п. 9.3.1, и тщательно перемешивают на вортексе. После тщательного перемешивания полученного раствора в пробирках на вортексе, его используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

9.4.2 Подготовка проб сухого молока

9.4.2.1 Восстановление сухого молока

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

В стаканы вместимостью 100 см^3 или 150 см^3 помещают 2 параллельные навески образца сухого молока, взвешенные с точностью до 0,1 г. Массы навесок в зависимости от содержания жира составляют:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;
- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5 – 10 см^3 приливают дистиллированную воду, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения сухого молока растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см^3, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

9.4.2.2 Получение подготовленных проб восстановленного сухого молока

Получение подготовленных проб восстановленного сухого молока проводят согласно п. 9.4.1.2, используя для этого пробы восстановленного сухого молока, приготовленные по п. 9.4.2.1. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

9.4.3 Подготовка проб творога, коктейлей молочных, кисломолочных продуктов, сыра, масла сливочного, мороженого на молочной основе

9.4.3.1 Предварительная подготовка проб

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с п. 9.1. Образцы масла сливочного, охлажденные до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки, перемешивают и доводят температуру от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Для остальных образцов доводят температуру от 20 °С до 25 °С, выдерживая при комнатной температуре, после чего

гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера (жидкие образцы тщательно перемешивают).

9.4.3.2 Получение подготовленных проб творога, коктейлей молочных, кисломолочных продуктов, сыра, масла сливочного, мороженого на молочной основе

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 0,50 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 3,5 $см^3$ дистиллированной воды и отмеренные пипеткой 4,0 $см^3$ дихлорметана. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе, а затем при переворачивании на ротаторе в течение 15 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 2000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 50 $мм^3$, и переносят ее в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 200 $мм^3$ буфера для разбавления, приготовленного по п. 9.3.1, и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.4.4 Подготовка проб молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки

9.4.4.1 Восстановление сухой молочной сыворотки

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

В стаканы вместимостью 100 $см^3$ или 150 $см^3$ помещают 2 параллельные навески образца массой 12,5 г, взвешенные с точностью до 0,1 г.

Затем приливают небольшими порциями по 10 – 20 $см^3$ дистиллированную воду, нагретую до температуры (40 ± 5) ^{0}С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения навески растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

9.4.4.2 Получение подготовленных проб восстановленной сухой молочной сыворотки

Получение подготовленных проб восстановленной сухой молочной сыворотки проводят согласно п.9.4.3.2, используя для этого пробы восстановленной сухой молочной сыворотки, приготовленные по п. 9.4.4.1. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

9.4.5 Подготовка проб сгущенного молока

9.4.5.1 Получение восстановленного сгущенного молока

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

В стаканы вместимостью 100 $см^3$ или 150 $см^3$ помещают 2 параллельные навески образца массой 25,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5 – 10 $см^3$ приливают дистиллированную воду, нагретую до температуры 30 °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения образца содержимое стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

9.4.5.2 Получение подготовленных проб восстановленного сгущенного молока

Получение подготовленных проб восстановленного сгущенного молока проводят согласно п. 9.4.1.2, используя для этого пробы восстановленного сгущенного молока, приготовленные по п. 9.4.5.1. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

9.4.6 Подготовка проб мяса

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 $см^3$ и в каждую пробирку добавляют 4,0 $см^3$ дистиллированной воды. Содержимое пробирок тщательно перемешивают на вортексе, а затем при переворачивании на ротаторе в течение 15 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 2000 g, 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость объемом 50 $мм^3$, и переносят ее в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 $см^3$. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 350 $мм^3$ буфера для разбавления, приготовленного по п. 9.3.1, и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.5 Подготовка тест-систем

9.5.1 Предварительная подготовка и правила обращения с тест-системами

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

Перед использованием реагенты необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов.

Особенное внимание следует обратить на раствор субстрата, в котором при

температуре 4 °С выпадает осадок. Перед применением раствор субстрата, предварительно нагретый до температуры от 20 °С до 25 °С, необходимо аккуратно перемешать до растворения осадка.

Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-систем других партий не допускается.

Не допускается использование реагентов, имеющих следующие признаки распада:

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

9.5.2 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 16 + 2N_{SMP}, \quad (1)$$

где N_{SMP} – количество образцов;

16 – количество лунок для градуировочных растворов и бланка.

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

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

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

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

где Б – бланк,

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

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

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

А, В, … Н – обозначения лунок в стрипах.

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

9.5.3 Приготовление моющего буфера

В коническую колбу вместимостью 500 $см^3$ вносят дозатором аликвоту 20×концентрата моющего буфера, подготовленного по п. 9.5.1, и добавляют цилиндром в 19 раз больший объем дистиллированной воды, после чего содержимое колбы перемешивают. Требуемый объем аликвоты 20×концентрата моющего буфера V_K, $см^3$, определяют, исходя из планируемого к использованию количества стрипов N_{STR}, по формуле:

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

Полученный раствор используют свежеприготовленным.

9.6 Приготовление раствора конъюгата

Раствор готовится непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

100×концентрат конъюгата, подготовленный по п. 9.5.1, центрифугируют в следующем режиме: от 20 °С до 25 °С, 1000 g, 1 мин. Отбирают дозатором аликвоту 100×концентрата конъюгата и переносят в микроцентрифужную пробирку или пробирку вместимостью 5 $см^3$. В пробирку добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления, приготовленный по п. 9.3.1, из расчета 990 $мм^3$ на 10 $мм^3$ 100×концентрата конъюгата (100:1) и перемешивают на вортексе. 100×концентрат конъюгата сразу же убирают в холодильник и хранят в соответствии с п. 8.

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

$$V = \frac{25 \cdot (N_W - 2) + V_1}{100}, \quad (3)$$

где V_1 - объем раствора конъюгата, приготавливаемого в запас, $мм^3$ (не менее 25 $мм^3$).

Приготовленный раствор коньюгата следует предохранять от действия света.

9.7 Приготовление раствора антител

Раствор готовится непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

100×концентрат антител, подготовленный по п. 9.5.1, центрифугируют в следующем режиме: от 20 °С до 25 °С, 1000 g, 1 мин. Отбирают дозатором аликвоту 100×концентрата антител и переносят в в микроцентрифужную пробирку или пробирку вместимостью 5 $см^3$. В пробирку добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления, приготовленный по п. 9.3.1, из расчета 990 $мм^3$ на 10 $мм^3$ 100×концентрата антител (100:1) и перемешивают на вортексе. 100×концентрат антител сразу же убирают в холодильник и хранят в соответствии с п. 8.

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

$$V = \frac{25 \cdot (N_W - 2) + V_1}{100}, \quad (4)$$

где V_1 – объем раствора антител, приготавливаемого в запас, мм^3 (не менее 25 мм^3).

9.8 Приготовление градуировочных растворов

9.8.1 Приготовление градуировочного раствора № 6

К содержимому флакона с лиофилизированным стандартом (с концентрацией 4 нг/см^3 в восстановленном стандарте) добавляют отмеренные дозатором 2 см^3 буфера для разбавления, приготовленного по п. 9.3.1. Содержимое закрытого флакона перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

9.8.2 Приготовление градуировочных растворов № 1 - № 5

Градуировочные растворы № 1 – № 5 готовят путем последовательного разбавления градуировочного раствора № 6, приготовленного по п. 9.8.1, следующим образом. В пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см^3 или стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 вносят аликвоту соответствующего градуировочного раствора и аликвоту буфера для разбавления, приготовленного по п. 9.3.1. Раствор, от которого отбирается аликвота, и объемы аликвот, используемые для приготовления градуировочных растворов, указаны в таблице 4. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Таблица 4 – Схема приготовления градуировочных растворов

Номер град. раствора	Концентрация градуировочного раствора, нг/см^3	Источник аликвоты раствора бензилпенициллина для приготовления градуировочного раствора	Объем аликвоты раствора бензилпенициллина	Объем буфера для разбавления
6	4,000	–	–	–
5	2,000	град. раствор № 6	250 мм^3	250 мм^3
4	1,000	град. раствор № 5	250 мм^3	250 мм^3
3	0,500	град. раствор № 4	250 мм^3	250 мм^3
2	0,250	град. раствор № 3	250 мм^3	250 мм^3
1	0,125	град. раствор № 2	250 мм^3	250 мм^3

9.8.3 Хранение градуировочных растворов

Приготовленные по пп. 9.8.1, 9.8.2 градуировочные растворы № 1 – № 6 делят на отдельные аликвоты, которые хранят при температуре минус 20 °С в течение срока хранения и размораживают в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С. Размороженные растворы повторному замораживанию не подлежат.

10 Выполнение измерений

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

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

- в лунки А1, А2 – две аликвоты объемом 100 мм^3 буфера для разбавления,

приготовленного по п. 9.3.1 (бланк);

- в лунки В1, В2 – две аликвоты объемом 50 мм^3 буфера для разбавления, приготовленного по п. 9.3.1 (нулевой градуировочный раствор);
- в лунки С1 – Н2 – по две аликвоты объемом 50 мм^3 каждого градуировочного раствора (№1 – №6);
- в лунки А3 – Н6 – аликвоты объемом 50 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

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

Примечание: при выполнении измерений согласно п. 10.10 с использованием автоматического микропланшетного фотометра с референсным фильтром на 630 нм (620 нм), бланк в лунки микротитровального планшета не вносят. Освободившиеся лунки используют для градуировочных растворов или растворов проб.

10.2 В каждую лунку микротитровального планшета, **за исключением лунок А1, А2,** вносят отобранный дозатором раствор коньюгата, приготовленный по п. 9.6, объемом 25 мм^3, затем вносят отобранный дозатором раствор антител, приготовленный по п. 9.7, объемом 25 мм^3.

10.3 Закрывают планшет пленкой «парафильм» или заклеивают скотчем. Перемешивают содержимое лунок планшета на вортексе в течение 10 с.

10.4 Помещают планшет в холодильник при температуре от 2 °С до 8 °С и инкубируют в темноте в течение 60 мин.

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

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

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

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

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

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

10.10 Немедленно после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в

каждой лунке планшета на автоматическом микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

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

11 Обработка результатов измерений

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

Программным обеспечением строится градуировочная зависимость $\lg\left[B'/(B_0 - B)\right]$ от десятичного логарифма концентрации вида

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

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

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

B' – скорректированная оптическая плотность раствора, рассчитывается по формуле

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

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

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

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

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

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

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

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

где X – концентрация антибиотиков группы пенициллинов в пробе мкг/кг;

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

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

F – фактор разбавления пробы, приведенный в таблице 5.

Таблица 5 – Факторы разбавления

Виды продукции	Значения фактора разбавления
Мясо	40
Молоко сгущенное	8
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое восстановленное	2
Творог, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, коктейли молочные, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженое на молочной основе	40

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

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

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

Окончательный результат измерений округляют до второго знака после десятичной запятой для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого восстановленного, молока сгущенного и до первого знака после десятичной запятой для остальных видов продукции.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений, приведенный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы пенициллинов в образце согласно п. 14.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы пенициллинов в образце согласно п. 14.3.

12 Контроль бланка

Данная процедура проводится, если при выполнении измерений в соответствии с разделом 10 бланк в лунки микротитровального планшета согласно п. 10.1 не вносят, и оптическая плотность по п. 10.10 измеряется с использованием референсного фильтра.

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

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

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

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

13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

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

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

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

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

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

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

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

r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 6, %.

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

14 Оформление результатов измерений

14.1 Форма представления результата измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Если конечный результат измерений $\overline{X}$ оказывается меньше, чем

соответствующее данному виду продукции значение предела измерения X_{LQ}, приведенное в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы пенициллинов в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

менее X_{LQ},

где X_{LQ} – значение предела измерений, приведенное в разделе 1.

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

Если конечный результат измерений $\overline{X}$ оказывается больше, чем соответствующее данному виду продукции значение верхней границы диапазона измерений X_{HL}, приведенное в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой концентрации антибиотиков группы пенициллинов в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

более X_{HL},

где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений, приведенное в разделе 1.

15 Контроль точности результатов измерений

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

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

15.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения массовой концентрации антибиотиков группы пенициллинов при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с разделом 13.

15.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами оператор-время, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6-2002 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\overline{X_1}$, $\overline{X_2}$ согласно разделу 10, варьируя факторы промежуточной прецизионности оператор, время и обеспечивая контроль повторяемости согласно разделу 13. За результат измерений принимают

среднее арифметическое значение двух результатов $\overline{X_1}, \overline{X_2}$

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

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

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

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

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

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 6, %.

15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

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

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости согласно разделу 13.

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

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

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

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

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

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

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

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

k – коэффициент, равный 1,6;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 6.

При превышении значения критической разности для разрешения различий

между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 5 СТБ ИСО 5725-6-2002.

Таблица 6 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Мясо	16	13	15
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое восстановленное, молоко сгущенное	12	17	18
Остальные матрицы	16	17	19

15.4 Контроль правильности

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

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

15.4.1 ОК, представляющим собой рабочие пробы с добавкой

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

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

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

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

m – масса навески пробы, г.

Величина массовой концентрации антибиотиков группы пенициллинов в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

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

15.4.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

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

Критерием приемлемости является условие

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

где $K_{отн.}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 6.

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

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

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

С помощью КК контролируют следующие показатели точности:

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

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [4] и СТБ ИСО 5725-6-2002, раздел 6.

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

Примечание: При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы данные измерений, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики может быть заявлено только в том случае, если показатель повторяемости, рассчитанный по накопленным лабораторией данным, статистически не превышает установленных методикой значений.

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

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора бензилпенициллина, приготовленного из бензилпенициллина гидрохлорида в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Предварительно установленная массовая концентрация антибиотиков группы пенициллинов в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку бензилпенициллина в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

15.5.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

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

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

- Предупреждающие границы

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

- Границы регулирования

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

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

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

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

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

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

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

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

где N – общее число измерений (точек) на КК, для получения значений центральной линии и границ необходимо, чтобы $N = 15..20$;
d_2 – коэффициент, d_2=1,128.

15.5.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$\overline{\mathrm{Rec}} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Rec}_i}{N}, \tag{27}$$

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 бензилпенициллина, по формуле

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

где X_i – массовая концентрация антибиотиков группы пенициллинов в пробе с добавкой, полученное для i-го измерения, мкг/кг;

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

- Предупреждающие границы

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

- Границы регулирования

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

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

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} \left(\overline{Rec} - Rec_i\right)^2}{N-1}} \qquad (31)$$

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

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

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

16 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

ГОСТ 8.010–99	Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026–76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 24104–2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы,

	основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29169–91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой
ГОСТ 29227–91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
СТБ ИСО 5725–2–2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2 Основной метод измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725–4–2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4 Основные методы определения правильности стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725–6–2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике

Библиография

[1]	VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, V.J. Barwick and S.L.R. Ellison, LGC/VAM/1998/088
[2]	ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения
[3]	ТУ 2631-081-44493179-02 Метилен хлористый (дихлорметан)
[4]	ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта

gost.e-ecolog.ru