

**Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии»
(БелГИМ)**

**СВИДЕТЕЛЬСТВО О МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ ПОДТВЕРЖДЕНИИ ПРИГОДНОСТИ
МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ (МВИ) № 1110МПП/2018**

Обозначение и наименование методики выполнения измерений:

МВИ.МН 5230-2015 «Массовая доля зеараленона в зерне, зернобобовых и масличных культурах, продуктах их переработки. Методика выполнения измерений методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН»» с извещением №1 об изменении

Заявитель: Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Разработчик: Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Методика выполнения измерений с извещением №1 об изменении соответствует требованиям, установленным в ТКП 8.006-2011 «Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь. Метрологическое подтверждение пригодности методик выполнения измерений. Правила проведения работ».

Свидетельство о метрологическом подтверждении пригодности методики выполнения измерений выдано на основании экспертного заключения по результатам метрологической экспертизы от 10.07. 2018 г.

Заместитель директора по науке



Н.В.Баковец

ОДО "КОМПРОДСЕРВИС"
+375 (29) 6646019 +7 (499) 7040550
+375 (29) 3365054 info@komprod.com
КАМЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦЫИ
РЕСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ



ОКПО 02568454
УНН 100055197
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства
**"БЕЛАРУСКИ ДЗЯРЖАЎНЫ
ІНСТЫТУТ МЕТРАЛОГІІ"**
- БелДИМ -

Старавіленскі тракт 93, г. 220053, Мінск,
Тэлефон (017) 233 55 01 Факс (017) 288 09 38
Эл. пошта: info@belgim.by

IBAN BY11 BPSB 3012 1027 7601 4933 0000
Рэгіянальная дырэкцыя №700 па г. Мінску
і Мінскай вобласці ААТ «БПС-Сбербанк»,
BIC SWIFT BPSBBY2X г. Мінск праспект Машэрава, 80
УНП 100055197, АКПА 02568454

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства
**"БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ИНСТИТУТ МЕТРОЛОГИИ"**
- БелГИМ -

Старовиленский тракт 93, 220053, Минск
Телефон +375 17 233 55 01 Факс +375 17 288 09 38
Эл. почта: info@belgim.by

IBAN BY11 BPSB 3012 1027 7601 4933 0000
Региональная дирекция №700 по г. Минску
и Минской области ОАО «БПС-Сбербанк»,
BIC SWIFT BPSBBY2X, г. Минск проспект Машерова, 80
УНП 100055197, ОКПО 02568454

10.07. 2018 г. № 28-12/9645
На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 1110/2018 об аттестации МВИ

**Массовая доля зеараленона в зерне, зернобобовых
и масличных культурах, продуктах их переработки. Методика выполнения
измерений методом иммуноферментного анализа
с использованием набора реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН».**

Методика выполнения измерений с извещением №1 об изменении, разработанная Институтом биоорганической химии НАН Беларуси, и регламентированная в **МВИ.МН 5230-2015 «Массовая доля зеараленона в зерне, зернобобовых и масличных культурах, продуктах их переработки. Методика выполнения измерений методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН»**», аттестована в соответствии с ТКП 8.006-2011.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по разработке и экспериментальному исследованию МВИ.

В результате аттестации установлено, что МВИ извещением №1 об изменении соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками при принятой доверительной вероятности $P=0,95$:

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Группы продуктов	Повторяемость σ_r , %	Промежуточная прецизионность $\sigma_{(TO)}$, %
Массовая доля зеараленона	от 50,0 до 800,0 вкл.	Зерно, зернобобовые культуры, мукомольно-крупяные, хлебобулочные и макаронные изделия	7,9	9,5
		Продукты масложировой промышленности, масличные культуры, корма, глютен	8,7	12,5

Заместитель директора по науке



Н.В.Баковец

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель директора по науке БелГИМ

Н.В. Баковец

2018

ЭКСПЕРТНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам метрологической экспертизы
извещения об изменении методики выполнения измерений (МВИ)

Наименование МВИ: Определение зеараленона в кормах и комбикормах методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов "ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН" ТУ ВУ 100185129.134-2015. Методика выполнения измерений

Разработчик: Институт биоорганической химии НАН Беларуси

На метрологическую экспертизу представлены следующие документы:

- 1 Извещение №1 об изменении МВИ.МН 5230-2015.
- 2 Отчет об экспериментальных исследованиях метрологических характеристик МВИ с извещением №1 об изменении.

По результатам метрологической экспертизы установлено:

1 Представленная методика с извещением №1 об изменении устанавливает методику выполнения измерений массовой доли зеараленона в зерне, зернобобовых и масличных культурах, продуктах их переработки методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов "ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН" и обладает следующими метрологическими характеристиками:

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Группы продуктов	Повторяемость σ_n , %	Промежуточная прецизионность $\sigma_{(10)}$, %
Массовая доля зеараленона	от 50,0 до 800,0 вкл.	Зерно, зернобобовые культуры, мукомольно-крупяные, хлебобулочные и макаронные изделия	7,9	9,5
		Продукты масложировой промышленности, масличные культуры, корма, глютен	8,7	12,5

2 Методика с извещением №1 соответствует требованиям ТКП 8.006-2011 «Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь. Метрологическое подтверждение пригодности методик выполнения измерений. Правила проведения работ».

3 Методика с извещением №1 может быть использована для выполнения измерений массовой доли зеараленона в зерне, зернобобовых и масличных культурах, продуктах их переработки методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов "ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН".

Начальник отдела испытаний пищевой
и сельскохозяйственной продукции

Г.В. Артеменко

Национальная академия наук Беларуси

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке
БелГИМ



«10» _____ 2018 г.


УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора
Института биоорганической химии
НАН Беларуси



« _____ » _____ 2018 г.


Н.Б. Хрипач

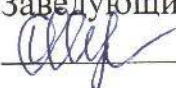
Извещение №1 об изменении

МВИ.МН 5230-2015

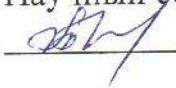
Определение зеараленона в кормах и комбикормах методом
иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-
ЗЕАРАЛЕНОН» ТУ ВУ 100185129.134-2015

РАЗРАБОТЧИК

Институт биоорганической
химии НАН Беларуси

Заведующий лабораторией
 О.В. Свиридов

Ведущий научный сотрудник
 И.И. Вашкевич

Научный сотрудник
 Т.В. Терентьева

Научный сотрудник
 А.А. Ястребова

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 1110 / 2018
об аттестации МВИ от 10.07.2018 г.

МИНСК, 2018

ГНУ «ИБОХ НАН Беларуси»		ИЛ	Извещение №1		Обозначение документа МВИ.МН 5230-2015	
Дата выпуска		Срок изменения			Лист 2	Листов 2
ПРИЧИНА		Изменение области применения				Код -
УКАЗАНИЕ О ЗАДЕЛЕ						
УКАЗАНИЕ О ВНЕДРЕНИИ						
ПРИМЕНЯЕМОСТЬ						
РАЗОСЛАТЬ		Всем абонентам				
ПРИЛОЖЕНИЕ		На 25 листах				
ИЗМ.		СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ				
1						

Титульный лист

Наименование МВИ изложить в редакции:

Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь

**МАССОВАЯ ДОЛЯ ЗЕАРАЛЕНОНА В ЗЕРНЕ, ЗЕРНОБОБОВЫХ И МАСЛИЧНЫХ
КУЛЬТУРАХ, ПРОДУКТАХ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ**

Методика выполнения измерений методом иммуноферментного анализа
с использованием набора реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН»

Листы 2-21 заменить.
Листы 22-25 ввести вновь.



Составил						
Проверил				Н. контр.		
Изменение внес						

СОДЕРЖАНИЕ

	Вводная часть	3
1	Нормативные ссылки	3
2	Метод измерений	5
3	Точность измерений	5
4	Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы	7
5	Требования безопасности и квалификации операторов	10
5.1	Общие требования безопасности	10
5.2	Требования безопасности при работе с метанолом	10
5.3	Требования к квалификации операторов	11
6	Требования к условиям измерений	11
7	Условия хранения набора реагентов	11
8	Подготовка к выполнению измерений	11
8.1	Приготовление растворов	11
8.2	Отбор образцов и подготовка проб	13
8.3	Приготовление раствора пробы	14
8.4	Подготовка набора реагентов к выполнению измерений	14
8.5	Подготовка микропланшетов	15
9	Выполнение измерений	15
10	Обработка результатов измерений	17
10.1	Построение градуировочного графика	17
10.2	Расчет массовой доли зеараленона	18
11	Форма представления результатов измерений	19
12	Контроль точности результатов измерений	19
12.1	Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости	19
12.2	Контроль результатов, полученных в промежуточных условиях прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор»	20
12.3	Контроль правильности	20
12.4	Контроль стабильности результатов измерений с использованием контрольных карт Шухарта (ККШ)	23
	Библиография	25



Вводная часть

Настоящая методика выполнения измерений (далее – МВИ) устанавливает методику выполнения измерений зеараленона в зерне (пшеница, рожь, тритикале, ячмень, рис, овес, просо, гречиха, кукуруза), зернобобовых (горох, фасоль, нут, чечевица, маш, чина, вика, люпин) и масличных культурах (соя, рапс, подсолнечник, лен), продуктах их переработки: мукомольно-крупяных (мука, крупы, отруби, мучки), макаронных и хлебобулочных изделиях, продукции масложировой промышленности (жмыхи, шроты), а также в кормах растительного происхождения, комбикормах и глутенах в целях ветеринарно-санитарной экспертизы и санитарно-гигиенического контроля методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа с применением набора реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН», производства Института биоорганической химии НАН Беларуси [1].

МВИ позволяет выполнять измерения массовой доли зеараленона в диапазоне измерений от 50,0 до 800,0 мкг/кг.

Предел измерений (LOQ) определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

Настоящая МВИ разработана в соответствии с ГОСТ 8.010.

1 Нормативные ссылки

1.1 В настоящей МВИ использованы ссылки на следующие технические нормативные правовые акты в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА):

СТБ ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения

СТБ ИСО 5725-3-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности 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



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

СТБ 1499-2004 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 8.010-2013 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения

ГОСТ 12.0.004-90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019-79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021-75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4780-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118 -77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995-77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 13496.0-80 Комбикорма, сырьё. Методы отбора проб

ГОСТ 13586.3-83 Зерно. Правила приемки и отбора проб

ГОСТ 13979.0-86 Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ OIML 76-1-2011 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования испытания

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

ГОСТ 27668-88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования



Примечание – При пользовании МВИ целесообразно проверить действие ТНПА по каталогу, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененными (измененными) ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

2 Метод измерений

2.1 При выполнении измерений массовой доли зеараленона применяют набор реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН», действие которого основано на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа.

Микотоксины экстрагируют из анализируемых образцов водно-метальным раствором, подготовленные пробы и градуировочные растворы смешивают с раствором конъюгата в планшете для смешивания и переносят в иммуносорбент. В лунках планшетного иммуносорбента конъюгат зеараленона с ферментом – пероксидазой из корней хрена – конкурирует с зеараленоном в составе градуировочных растворов или экстрактов анализируемых проб за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами компоненты, к системе добавляют хромоген-субстратный раствор, который позволяет визуализировать реакции зеараленон-антитело. Связанный с антителами конъюгат фермента превращает хромоген в окрашенный продукт, при этом интенсивность окраски обратно пропорциональна массовой доле зеараленона. Реакцию окрашивания останавливают добавлением стоп-реагента. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на микропланшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известной массовой долей зеараленона строят градуировочную зависимость, с помощью которой определяют массовую долю зеараленона в анализируемых образцах.

3 Точность измерений

3.1 Настоящая МВИ обеспечивает получение результатов измерений массовой доли зеараленона при принятой доверительной вероятности $P = 95\%$ в указанном выше диапазоне измерений. Показатели точности результатов измерений и расширенная неопределенность приведены в таблицах 1 и 2.



Таблица 1 – Относительные значения показателя повторяемости σ_r , показателя промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$ с изменяющимся фактором «время+оператор» измерений массовой доли зеараленона при доверительной вероятности $P = 0,95$

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Группы продуктов	Повторяемость σ_r , %	Промежуточная прецизионность $\sigma_{I(TO)}$, %
Массовая доля зеараленона	от 50,0 до 800,0 включ.	Зерно, зернобобовые культуры, мукомольно-крупяные, хлебобулочные и макаронные изделия	7,9	9,5
		Продукты масложировой промышленности, масличные культуры, корма, глютен	8,7	12,5

В результате оценки показателя правильности для данной МВИ была установлена незначимость смещения для всех видов продукции во всем диапазоне измерений по МВИ, за исключением продуктов масложировой промышленности и глютен, масличных культур, кормов.

Статистическая значимость смещения учтена при оценивании неопределенности измерений массовой доли зеараленона в продуктах масложировой промышленности и глютен, масличных культур, кормов с использованием набора реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН».



Таблица 2 – Относительные значения предела повторяемости r , предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(TO)}$, относительного норматива контроля правильности K и относительной расширенной неопределенности U измерений массовой доли зеараленона при доверительной вероятности $P = 0,95$

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Группы продуктов	Предел повторяемости r , %	Предел промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(TO)}$, %	Норматив контроля правильности, K , %	Относительная расширенная неопределенность U , %
Массовая доля зеараленона	от 50,0 до 800,0 включ.	Зерно, зернобобовые культуры, мукомольно-крупяные, хлебобулочные и макаронные изделия	22,1	26,6	16,4	20,0
		Продукты масложировой промышленности, масличные культуры, корма, глютен	24,4	35,0	28,5	30,0

3.2 Указанные в таблицах 1, 2 метрологические характеристики оценивались на основании данных, полученных в эксперименте в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-3;
- показатели правильности – СТБ ИСО 5725-4;
- оценивание неопределенности – [2], [3], [8].

4 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

4.1 При выполнении измерений применяют средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы.

4.1.1 Автоматический микропланшетный фотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, с пределом допускаемой погрешности измерения оптической плотности не более 5 %.



4.1.2 Весы лабораторные высокого II класса точности с наибольшим пределом взвешивания не более 200 г и погрешностью взвешивания не более $\pm 0,1$ г по ГОСТ OIML 76-1-2011.

4.1.3 Водяная баня GFL 1012, обеспечивающая температуру нагрева $(39 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

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

4.1.5 Лабораторный встряхиватель, обеспечивающий частоту вращения до 300 об/мин.

4.1.6 Магнитная мешалка, частота вращения до 500 об/мин.

4.1.7 Мельница лабораторная, обеспечивающая измельчение с размером частиц не более 1 мм.

4.1.8 Восьмиканальный дозатор с диапазоном объема дозирования от 5 до 300 мм³ с шагом 1,0 мм³ и погрешностью дозирования не более 3 % со сменными одноразовыми наконечниками.

4.1.9 Одноканальные дозаторы переменного объема с диапазоном дозирования объемов: от 20 до 200 мм³ с шагом 1,0 мм³ и погрешностью дозирования не более $\pm 1,5$ %, от 100 до 1000 мм³ с шагом 5,0 мм³ и погрешностью дозирования не более $\pm 1,5$ % со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

4.1.10 Сита лабораторные для мукомольной промышленности с номинальным размером круглого отверстия в свету или квадратного отверстия сетки 1 мм по [4].

4.1.11 Секундомер электронный по ТУ РБ 100231303.011-2002.

4.1.12 Термостат, обеспечивающий температуру от 20 °C до 25 °C.

4.1.13 Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °C до плюс 8 °C в холодильной камере и не выше минус 18 °C в морозильной камерой по СТБ 1499.

4.1.14 Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

4.1.15 Колбы конические Кн-1-100-29/32 ТС по ГОСТ 25336.

4.1.16 Стаканы В1-1-100; В1-1-250; В1-1-500 по ГОСТ 25336.

4.1.17 Пробирки П-2-10-14/23 по ГОСТ 1770.

4.1.18 Пипетки 1-1-1-5; 1-1-1-25 по ГОСТ 29277.

4.1.19 Фильтры обеззоленные «белая лента» по [5].

4.1.20 Цилиндры 1-50-1; 1-100-1; 1-500-1 по ГОСТ 1770.

4.1.21 Бумага индикаторная универсальная по [6].

4.1.22 Стеклянные емкости с плотно закрывающимися крышками вместимостью 250 и 100 см³.



4.1.23 Пленка «парафильм» или скотч.

4.1.24 Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметр 100 мм, высота 15 мм или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

4.1.25 Штатив для пробирок.

4.1.26 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.1.27 Кислота соляная х.ч. (плотность 1,19 г/см³, массовая доля HCl 38,3 %) по ГОСТ 3118.

4.1.28 Метанол по ГОСТ 6995.

4.1.29 Натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328.

4.1.30 Флаконы из пластмассы вместимостью 20 см³ с закручивающейся крышкой по [7].

4.2 Набор реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН» [1] производства ИБОХ НАН Беларуси (далее – набор) в стандартной комплектации:

- иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по восемь лунок, с иммобилизованным моноклональным антителом, один планшет;

- планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по восемь лунок, один планшет;

- градуировочный раствор C₀ с концентрацией зеараленона 0,0 мкг/кг, объемом 0,7 см³;

- градуировочный раствор C₁ с концентрацией¹⁾ зеараленона 50,0 мкг/кг, объемом 0,7 см³;

- градуировочный раствор C₂ с концентрацией¹⁾ зеараленона 100,0 мкг/кг, объемом 0,7 см³;

- градуировочный раствор C₃ с концентрацией¹⁾ зеараленона 300,0 мкг/кг, объемом 0,7 см³;

- градуировочный раствор C₄ с концентрацией¹⁾ зеараленона 800,0 мкг/кг, объемом 0,7 см³;

- конъюгат, 21-кратный концентрат, объемом 0,7 см³;

- промывочный раствор, 10-кратный концентрат, объемом 30 см³;

- раствор для разбавления конъюгата, объемом 14 см³;

- раствор ТМБ²⁾, объемом 0,7 см³;

¹⁾ Для градуировочных растворов установлена условная концентрация. Действительные значения величин концентраций градуировочных растворов, входящих в комплект поставки, учитывают фактический коэффициент разбавления пробы, равный 20, который получают в результате процедуры пробоподготовки. Этот факт позволяет находить значение массовой доли зеараленона в анализируемом образце по результату измерений массовой доли зеараленона в подготовленном растворе пробы, полученному сразу по градуировочной кривой.

²⁾ В случае поставки хромоген-субстратного раствора в готовом к использованию виде компонентом набора является хромоген-субстратный раствор, объемом 14 см³



- субстратный буферный раствор²⁾, объемом 14 см³;
- стоп-реагент, объемом 15,0 см³.

Допускается применять другие средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, обеспечивающие выполнение измерений с требуемой точностью согласно разделу 3.

5 Требования безопасности и квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реагентами и правила общей техники безопасности при работе в химической лаборатории согласно ГОСТ 12.1.007.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования электробезопасности по ГОСТ 12.1.019.

Помещение, в котором выполняют отбор проб, измерения, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021, пожарной сигнализацией и пожаротушения по ГОСТ 12.4.009 и соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004

Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

Организация обучения работающих безопасности труда осуществляется по ГОСТ 12.0.004.

5.2 Требования безопасности при работе с метанолом

Персонал, работающий с метанолом и его растворами, должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования инструкции по технике безопасности при работе с метанолом, утвержденной в установленном порядке.

Все работы с метанолом и его растворами должны проводиться строго в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты (фартуки, перчатки, очки). Запрещается работать с метанолом при выключенной приточно-вытяжной вентиляции и без применения средств индивидуальной защиты.



5.3 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или среднее специальное образование, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа и освоившие выполнение измерений по настоящей МВИ.

6 Требования к условиям измерений

6.1 При отборе проб и выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

6.1.1 Температура окружающего воздуха от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

6.1.2 Относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре плюс 25 °С.

7 Условия хранения набора реагентов

7.1 Набор должен храниться в упаковке изготовителя при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание целого набора и отдельных компонентов не допускается.

7.2 Промывочный раствор, градуировочные растворы, конъюгат, раствор для разбавления конъюгата, а также субстратный буферный раствор, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов и последующей укупорки можно хранить при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение срока годности набора.

7.3 Неиспользованные стрипы иммуносорбента следует хранить упакованными в плотно закрытом фольгированном пакете при температуре окружающего воздуха от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Приготовление растворов

8.1.1 Приготовление 20 %-го раствора натрия гидроокиси

Взвешивают $(10,0 \pm 0,1)$ г натрия гидроокиси в стакане вместимостью 100 см³ и растворяют в 40 см³ дистиллированной воды. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в полиэтиленовую емкость с плотно закрывающейся крышкой.

8.1.2 Приготовление 1М раствора соляной кислоты

В стакан вместимостью 100 см³ цилиндром приливают 88 см³ дистиллированной воды и 8 см³ концентрированной соляной кислоты, тщательно перемешивают. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в стеклянную емкость с притертой пробкой.



8.1.3 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=70:30

В стакан вместимостью 500 см³ цилиндром приливают 350 см³ метанола и 150 см³ дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С – 3 мес.

8.1.4 Приготовление раствора в объемном соотношении метанол:вода=35:65

В стакан вместимостью 100 см³ цилиндром приливают 35 см³ метанола и 65 см³ дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С – 3 мес.

8.1.5 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочий раствор конъюгата готовят в пробирке или флаконе, разбавляя концентрат конъюгата в 21 раз раствором для разбавления конъюгата в соотношении 1:20.

Объем рабочего раствора конъюгата должен быть приготовлен из расчета 100 мм³ рабочего раствора конъюгата на каждую лунку.

Рабочий раствор конъюгата перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.1.6 Приготовление хромоген-субстратного раствора

Хромоген-субстратный раствор готовят в темных пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор ТМБ разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (ТМБ:субстратный буферный раствор = 1:20) из расчета 100 мм³ на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 см³ вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют соответствующее количество раствора ТМБ и интенсивно перемешивают в течение от 30 до 40 с.

Приготовленный или поставленный в набор хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен



быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

8.1.7 Приготовление рабочего промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора интенсивно встряхивают в течение (10-20) с, в случае образования кристаллов помещают флакон на водяную баню или термостат при температуре 37 °С и выдерживают до полного растворения кристаллов.

Разводят нужный объем раствора в 10 раз (соотношение по объему 1+9) дистиллированной водой. Для этого в мерный стакан отбирают необходимый объем концентрата, заданный количеством используемых стрипов, доводят дистиллированной водой до нужного объема и перемешивают полученный рабочий раствор на магнитной мешалке.

Срок хранения раствора при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С – 1 мес.

8.2 Отбор образцов и подготовка проб

8.2.1 Отбор образцов проводят по СТБ 1036, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 27668, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13979.0.

Образцы хранят в герметичных пакетах при температуре от плюс 2 °С до плюс 25 °С и относительной влажности не более 80 % - 3 нед. или в замороженном виде при температуре минус 18 °С – 6 мес в условиях, исключающих изменение влажности. Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С.

8.2.2 Исследуемый образец выдерживают при комнатной температуре и доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

Образцы зерна, зернобобовых, масличных, макаронных, крупяных изделий, продуктов переработки зерновых (отруби, жмыхи, шроты), кормов измельчают с помощью лабораторной мельницы, просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм и тщательно перемешивают.

Остаток образца на сите снова измельчают на мельнице лабораторной так, чтобы он весь прошел через сито с отверстиями диаметром 1 мм, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Образцы хлебобулочных изделий измельчают с помощью гомогенизатора или бытового блендера, перемешивают, образцы мукомольных изделий, глютен – тщательно перемешивают.



8.3 Приготовление раствора пробы

8.3.1 При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения.

Взвешивают $(5,0 \pm 0,1)$ г размолотого образца, приготовленного по п.8.2.2. Навеску исследуемой пробы помещают в коническую колбу вместимостью 100 см^3 и пипеткой добавляют 25 см^3 раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода = 70:30.

8.3.2 Коническую колбу закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, интенсивно встряхивают вручную или на встряхивателе в течение 7 мин. Колбы выдерживают не менее 20 мин для осаждения частиц пробы, затем быстро фильтруют от 10 до 15 см^3 верхнего слоя каждого раствора через фильтр «белая лента» в пробирки.

Контроль pH фильтрата проводят по универсальной индикаторной бумаге, доводя до значения 6-8, используя 1 М раствор соляной кислоты или 20 %-ый раствор гидроокиси натрия.

В пробирку отбирают дозатором $0,5 \text{ см}^3$ фильтрата и добавляют $0,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды. Раствор перемешивают и добавляют 1 см^3 раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода = 35:65.

Раствор перемешивают, пробирку закрывают пробкой и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

8.3.3 При выполнении измерений проб с массовой долей зеараленона, превышающей верхний предел измерений по настоящей МВИ, выполняют разбавление пробы, подготовленной по п. 8.3.2 раствором метанол:вода=35:65.

Степень разбавления зависит от ожидаемой массовой доли зеараленона в пробе продукции. Для этого в отдельной пробирке к одной части подготовленной аликвоты пробы (п.8.3.2) добавляют, в зависимости от необходимого разбавления, одну (1:1), две (1:2), три (1:3), четыре (1:4), пять (1:5) или более частей раствора метанол:вода = 35:65. При этом фактор разбавления F равен 2; 3; 4; 5; 6 или более, соответственно.

Пробы перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 ч.

8.4 Подготовка набора реагентов к выполнению измерений

Перед проведением измерений набор реагентов извлекают из холодильника и выдерживают при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C в течение от 0,5 до 1,0 ч.

Перед использованием все растворы из набора легко встряхивают в течение 10 с, избегая разбрызгивания и образования пены.



8.5 Подготовка микропланшетов

Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб в микропланшетах согласно рисунку 1 с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и раствора пробы требуется две лунки.

Лунка в стрипе	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₀	C ₀	П ₄	П ₄								
B	C ₁	C ₁	П ₅	П ₅								
C	C ₂	C ₂	П ₆	П ₆								
D	C ₃	C ₃	П ₇	П ₇								
E	C ₄	C ₄	П ₈	П ₈								
F	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉								
G	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀								
H	П ₃	П ₃	П ₁₁	П ₁₁								

C₀ – C₄ – градуировочные растворы в лунках A1-E1 стрипа №1 и A2-E2 стрипа №2.

П₁ – П₁₁ – растворы проб в лунках F-H стрипов №1 и №2 и в лунках A-H стрипов №3 и №4.

Рисунок 1 – Схема расположения лунок

В одной постановке используют не более четырех стрипов.

В рамку микропланшета разборного – иммуносорбента – устанавливают необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами.

В рамку микропланшета для смешивания устанавливают соответствующее количество стрипов.

Неиспользованные стрипы иммуносорбента возвращают в фольгированный пакет, заклеивают липкой лентой и помещают в холодильник.

9 Выполнение измерений

9.1 В чашку Петри или пластмассовую кювету вносят конъюгат в объеме из расчета 1 см³ на стрип.

Восьмиканальным дозатором отбирают 100 мм³ конъюгата и вносят в лунки планшета для смешивания (допускается использование одноканального дозатора). Затем в соответствующие лунки планшета для смешивания, размеченного согласно п. 8.5, одноканальным дозатором вносят



по 50 мм^3 каждого градуировочного раствора и аликвоты объемом 50 мм^3 двух параллельных растворов проб каждого исследуемого образца.

9.2 Растворы в лунках перемешивают восьмиканальным дозатором, три раза пипетируя раствор вверх и вниз, не допуская образования пены. Для каждого стрипа используют чистые наконечники.

Немедленно после перемешивания отбирают из планшета для смешивания восьмиканальным дозатором и вносят в соответствующие лунки иммуносорбента – микропланшета разборного с иммобилизованными антителами по 100 мм^3 градуировочных растворов и растворов проб вместе с конъюгатом.

Примечание:

– Временной интервал от начала перемешивания до начала инкубации не более 5 мин.

9.3 Закрывают планшет пленкой или скотчем, крышкой и инкубируют в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C .

9.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета.

В пластмассовую кювету для промывочного раствора вносят рабочий промывочный раствор по п. 8.1.7 в объеме из расчета 200 мм^3 на одну промывку при четырехкратном промывании каждой лунки.

Затем с применением восьмиканального дозатора проводят четырехкратное промывание планшета промывочным раствором порциями по 200 мм^3 на одно промывание каждой лунки.

При промывании планшета: контролируют заполнение всех лунок и полное удаление промывочного раствора; не допускают переполнения лунок и перетекания промывочного раствора между ними; выдерживают лунки, заполненные промывочным раствором, не менее 10 с.

Остатки промывочного раствора удаляют, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

9.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету вносят хромоген-субстратный раствор, приготовленный по п. 8.1.6, в объеме из расчета 1 см^3 на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мм^3 хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают планшет пленкой или скотчем, крышкой и инкубируют в течение 5 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C .



9.6 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят стоп-реагент в объеме из расчета 1 см^3 на стрип.

По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мм^3 стоп-реагента.

Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 В течение не более 15 мин после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм.

10 Обработка результатов измерений

10.1 Построение градуировочного графика

Обработка результатов измерений проводится с применением прилагаемого шаблона в формате Microsoft Excel (диск с шаблоном для обсчета получаемых данных поставляется изготовителем потребителю).

В соответствующие графы шаблона вносят полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов $C_0 - C_4$ и растворов образца.

Программа Excel с применением прилагаемого шаблона автоматически рассчитывает процент связывания для градуировочных растворов $C_1 - C_4$ и для раствора пробы относительно градуировочного раствора C_0 с массовой долей 0,0 мкг/кг зеараленона :

$$\frac{B_i}{B_0} \cdot 100 \%, \frac{B_p}{B_0} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где B_0 – средняя оптическая плотность градуировочного раствора C_0 , е.о.п;
 B_i – средняя оптическая плотность i -го градуировочного раствора ($i = 1, 2, 3, 4$), е.о.п.;

B_p - оптическая плотность раствора пробы, е.о.п.

Программа Excel с применением прилагаемого шаблона на основании внесенных оператором в таблицу раздела 1 прилагаемого шаблона параллельных измерений оптической плотности для каждого градуировочного раствора строит градуировочный график и автоматически рассчитывает параметры градуировочного графика.

Градуировочная зависимость должна иметь вид

$$Y = a + b \cdot X, \quad (2)$$

где



$$Y = \log it \left(\frac{B_i}{B_0} \right) = \lg \left(\frac{B_i/B_0}{1 - B_i/B_0} \right), \quad (3)$$

$$X = \lg C_i, \quad (4)$$

где C_i – массовая доля зеараленона в i -ом градуировочном растворе, мкг/кг.

Коэффициенты a и b вычисляют по формулам

$$a = \frac{\sum_{i=1}^4 y_i - b \sum_{i=1}^4 x_i}{4}, \quad (5)$$

$$b = \frac{4 \sum_{i=1}^4 x_i y_i - \sum_{i=1}^4 x_i \sum_{i=1}^4 y_i}{4 \sum_{i=1}^4 x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^4 x_i \right)^2}. \quad (6)$$

10.2 Расчет массовой доли зеараленона

Программа Excel с применением прилагаемого шаблона автоматически рассчитывает массовую долю зеараленона в пробе, C_p , мкг/кг

$$C_p = 10^{X_p}, \quad (7)$$

где X_p – логарифм массовой доли зеараленона в пробе, найденный по формуле

$$X_p = \frac{Y_p - a}{b}, \quad (8)$$

$$\text{где } Y_p = \lg \left(\frac{B_p/B_0}{1 - B_p/B_0} \right). \quad (9)$$

В случае дополнительного разбавления пробы по п. 8.3.3, массовая доля зеараленона C_p рассчитывается по формуле:

$$C_p = C_F \cdot F, \quad (10)$$

где C_F – значение массовой доли зеараленона, полученное при разбавлении пробы, мкг/кг;

F – фактор разбавления пробы.

За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости:

$$\bar{C} = \frac{C_1 + C_2}{2}, \quad (11)$$



где $\bar{C}$ – среднее арифметическое результатов двух измерений, мкг/кг;
 C_1 и C_2 – значения результатов двух измерений, мкг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Значение $\bar{C}$ принимают за окончательный результат, если выполняется неравенство:

$$|C_1 - C_2| \leq 0,01 \cdot \bar{C} \cdot r, \quad (12)$$

где r – относительное значение предела повторяемости согласно таблице 2, %.

Если соотношение (12) не выполняется, измерение пробы необходимо повторить.

11 Форма представления результатов измерения

Окончательный результат измерений массовой доли зеараленона C представляют в виде

$$\bar{C} \pm U_{абс}, \text{ мкг/кг.} \quad (13)$$

Значение расширенной неопределенности $U_{абс}$, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$U_{абс} = 0,01 \cdot \bar{C} \cdot U, \quad (14)$$

где U – относительная расширенная неопределенность, %, согласно таблице 2.

Если окончательный результат измерений оказывается меньше значения нижней границы соответствующего диапазона измерений, то вычисление массовой доли зеараленона не проводится, а дается односторонняя оценка массовой доли зеараленона C , мкг/кг, в виде

$$C < C_{LOQ}, \quad (15)$$

где C_{LOQ} – значение нижней границы соответствующего диапазона измерений согласно таблице 1.

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Контроль результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль результатов проводят в соответствии с СТБ ИСО 5725-6.



Расхождение между параллельными результатами измерений одного образца, полученное в условиях повторяемости при доверительной вероятности $P = 0,95$, должно удовлетворять условию

$$|C_1 - C_2| \leq 0,01 \cdot \bar{C} \cdot r, \quad (16)$$

где C_1 и C_2 – значения результатов двух параллельных измерений, мкг/кг;

$\bar{C}$ – среднее арифметическое результатов двух измерений, мкг/кг;

r – относительное значение предела повторяемости согласно таблице 2, %.

Если условие (16) не выполняется, то измерения необходимо повторить.

12.2 Контроль результатов, полученных в промежуточных условиях прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор»

Контроль проводят в соответствии с СТБ ИСО 5725-6.

Критическая разность CD для измерений, полученных лабораторией в промежуточных условиях прецизионности при соблюдении условий повторяемости при доверительной вероятности $P=0,95$ рассчитывается по формуле

$$CD = \sqrt{r^2_{I(TO)} - \frac{r^2}{2}}. \quad (17)$$

Расхождение между параллельными результатами измерений одного образца, полученное в промежуточных условиях прецизионности при доверительной вероятности $P=0,95$ должно удовлетворять условию

$$|\bar{C}_1 - \bar{C}_2| \leq 0,01 \cdot \bar{\bar{C}} \cdot CD, \quad (18)$$

где $\bar{C}_1$ и $\bar{C}_2$ – средние значения результатов измерения, полученные в промежуточных условиях прецизионности, рассчитаны по формуле (11), мкг/кг;

$\bar{\bar{C}}$ – среднее арифметическое результатов измерений, полученных в промежуточных условиях прецизионности, мкг/кг;

$r_{I(TO)}$ – относительное значение предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» согласно таблице 2, %.

Если условие (18) не выполняется, то один результат или оба являются неверными и измерения необходимо повторить.

12.3 Контроль правильности

Контроль правильности проводят в соответствии с СТБ ИСО 5725-6.

12.3.1 Количественная оценка применения лабораторией данного метода измерений проводится внутри лаборатории на основании оценки лабораторного смещения посредством сравнения результатов измерений с принятым эталонным значением образца сравнения, массовая доля которого должна находить в диапазоне измерений МВИ. В качестве образца сравнения



может быть использован референтный материал, естественно контаминированный микотоксинами, с сертифицированным значением (например, образцы Trilogy® Analytical laboratory, США) или образец, в котором массовая доля зеараленона установлена на основании межлабораторного сличительного эксперимента. При этом в качестве образца должны быть выбраны матрицы, для которых установлена незначимость смещения: зерно, зернобобовые культуры, мукомольно-крупяные, хлебобулочные и макаронные изделия.

Результат контроля правильности признают положительным, если в лаборатории при выполнении двух параллельных измерений выполняется условие

$$|X - \mu| < 2\sqrt{\sigma_{I(TO)(abc)}^2 - \frac{\sigma_{r(abc)}^2}{2}}, \quad (19)$$

$$\sigma_{I(TO)(abc)} = \frac{\sigma_{I(TO)} \cdot X}{100}, \quad (20)$$

$$\sigma_{r(abc)} = \frac{\sigma_r \cdot X}{100}, \quad (21)$$

где X – результат измерения, полученный в оцениваемой лаборатории, мкг/кг;

μ – сертифицированное значение образца сравнения, мкг/кг;

σ_r , $\sigma_{I(TO)}$ – относительные значения показателей повторяемости и показателя промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» согласно таблице 1.

Если неравенство (19) не выполняется, то измерения необходимо повторить. При невыполнении неравенства необходимо выяснить и устранить причины невыполнения неравенства (19) и повторить измерения.

12.3.2 В случае отсутствия эталонного образца сравнения оценка смещения может производиться путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением массовой доли зеараленона (рабочая проба с добавкой).

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая доля зеараленона в которой менее предела измерения данной МВИ, в которую внесена добавка.

Неопределенность значения массовой доли зеараленона в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности измерений.

Контроль правильности проводится с использованием добавок зеараленона. Величина массовой доли зеараленона в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений. Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из зеараленона в соответствии с



рекомендациями производителя. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы) зеараленона, при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации зеараленона в них не превышает 3 %.

В качестве образца должны быть выбраны матрицы, для которых установлена значимость смещения: продукты масложировой промышленности и глютен, масличные культуры, корма.

Добавка вносится непосредственно в пробирки с навеской проб. Из пробы отбирают шесть навесок. В каждую навеску вносят добавку зеараленона – массовая доля X_{REF} , мкг/кг, которая рассчитывается по формуле

$$X_{REF} = \frac{C_m \cdot V_m}{m_{np}}, \quad (22)$$

где C_m – концентрация добавленного раствора зеараленона, нг/см³;

V_m – объем добавленного раствора зеараленона, см³;

m_{np} – масса пробы с добавленным раствором зеараленона, г;

X_{REF} – установленное значение массовой доли зеараленона, мкг/кг.

В условиях повторяемости получают шесть результатов измерения массовой доли зеараленона в пробе с добавкой C_i .

За результат контрольного измерения $\overline{C}_k$, мкг/кг, принимают:

- при проведении контрольной процедуры результат измерения массовой доли зеараленона в ОК, рассчитанный по формуле (23) при выполнении условия повторяемости по п. 12.1 с использованием вместо относительного предела повторяемости r , приведенного в таблице 2, значения $1,43 \cdot r$.

$$\overline{C}_k = \frac{\sum_{i=1}^6 C_i}{6}, \quad (23)$$

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

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{C}_k - X_{REF}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \overline{C}_k, \quad (24)$$

где $K_{отн}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 2.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (24) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.



12.4 Контроль стабильности результатов измерений с использованием контрольных карт Шухарта (ККШ).

Контроль стабильности результатов измерений массовой доли зеараленона и интерпретация результатов осуществляется по показателям повторяемости σ_r и промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$ с использованием контрольных карт Шухарта в соответствии с СТБ ИСО 5725-6 и [9].

Применение ККШ основано на сопоставлении результатов контрольных процедур с установленными нормативами контроля: пределами регулирования, устанавливаемыми при доверительной вероятности $P = 0,997$, и пределами предупреждения, устанавливаемыми при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Число контрольных процедур в течение временного диапазона устанавливается в документах системы менеджмента качества лаборатории.

ККШ для каждого из контролируемых показателей качества результатов анализа строят по результатам измерений массовой доли зеараленона в исследуемых образцах по рассчитанным величинам размахов по формулам (25), (26). В работе участвует два аналитика.

Всего строится две ККШ: одна – для контроля стабильности результатов измерений массовой доли зеараленона по показателям повторяемости σ_r , другая – для контроля стабильности результатов измерений массовой доли зеараленона по показателю промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$. Алгоритм построения ККШ для двух контрольных измерений следующий:

- 1) На контрольных картах размаха и промежуточной прецизионности наносят следующие горизонтальные линии:

центральные линии	$CL_r = 1,128 \cdot 0,01 \cdot \sigma_r$	$CL_{I(TO)} = 1,128 \cdot 0,01 \cdot \sigma_{I(TO)}$
границы	$UCL_r = 2,834 \cdot 0,01 \cdot \sigma_r$	$UCL_{I(TO)} = 2,834 \cdot 0,01 \cdot \sigma_{I(TO)}$
предупреждения	$LCL_r = \text{нет}$	$LCL_{I(TO)} = \text{нет}$
границы	$UCL_r = 3,686 \cdot 0,01 \cdot \sigma_r$	$UCL_{I(TO)} = 3,686 \cdot 0,01 \cdot \sigma_{I(TO)}$
регулирования	$LCL_r = \text{нет}$	$LCL_{I(TO)} = \text{нет}$

где σ_r и $\sigma_{I(TO)}$ - относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» согласно таблице 1, %;

1,128; 2,834; 3,686 – коэффициенты для расчета центральной, предупреждающей, регулирующей границ ККШ (таблица 4 СТБ ИСО 5725-6);



2) Получают результаты контрольных измерений и рассчитывают результаты контрольных процедур относительных размахов:

а) в условиях повторяемости по формуле

$$r_k = \frac{C_1 - C_2}{\bar{C}}, \quad (25)$$

где C_1 и C_2 - результаты измерений массовой доли зеараленона, полученные в условиях повторяемости, мкг/кг;

$\bar{C}$ - среднее значение двух результатов, полученных в условиях повторяемости, мкг/кг.

б) в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами «время+оператор» по формуле

$$r_{kI(TO)} = \frac{C_1 - C_2}{\bar{C}}, \quad (26)$$

где C_1 и C_2 - значения результатов измерения, полученные в промежуточных условиях прецизионности, мкг/кг;

$\bar{C}$ - среднее значение результатов параллельных измерений массовой доли зеараленона в промежуточных условиях прецизионности, мкг/кг.

3) Результаты контрольных процедур (r_k , $r_{kI(TO)}$) наносят на ККШ, предназначенные для контроля повторяемости и промежуточной прецизионности. При заполнении ККШ по горизонтальной оси откладывают номер контрольной процедуры, по вертикальной оси - результаты контрольной процедуры.

При интерпретации ККШ сигналом к возможному нарушению стабильности процесса анализа может служить появление на ККШ следующих ситуаций:

- одна точка вышла за границу регулирования;
- девять точек подряд находятся в зоне выше половинной границы зоны предупреждения или по одну сторону от центральной линии;
- шесть возрастающих или убывающих точек подряд;
- четырнадцать попеременно убывающих и возрастающих точек;
- две из трех последовательных точек выше границы предупреждения;
- четыре из пяти последовательных точек выше половинной границы зоны предупреждения;
- пятнадцать последовательных точек в зоне регулирования выше или ниже центральной линии;
- восемь последовательных точек по обеим сторонам центральной линии и ни одной в зоне регулирования.

При появлении одной из вышеперечисленных ситуаций проводят анализ и устранение причин несоответствий.



Библиография

[1] ТУ ВУ 100185129.134-2015 Набор реагентов для определения зеараленона в кормах для животных, пищевой продукции и продовольственном сырье методом иммуноферментного анализа «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН»

[2] «Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК по количественному описанию неопределенности в аналитических измерениях»

[3] VAM Project 3.2.1 Development and Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data»

[4] ТУ 5149-001-56476476-02 Сита лабораторные контрольные металлотканые У1-ЕСЛ-К. Номенклатура

[5] ТУ 2642-001-13927158-2003 Фильтры обеззоленные «Синяя лента», «Белая лента», «Красная лента»

[6] ТУ 6-09-1181-89 Бумага индикаторная универсальная для определения pH 1-10 и 7-14. Технические условия

[7] ТУ РБ 100626757.001 Изделия пластмассовые для упаковки и укупорки лекарственных средств

[8] ISO 21748:2010 «Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения»

[9] ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты Шухарта

