

ДЗЯРЖАУНЫ КАМІТЭТ ПА СТАНДАРТЫЗАЦЫЎ  
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства  
"БЕЛАРУСКИ ДЗЯРЖАУНЫ  
ІНСТЫТУТ МЕТРАЛОГІЎ"  
- БелДІМ -

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



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Республиканское унитарное предприятие  
"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

окпо 02568454  
унп 100055197

05.12.2019 г. № 28-12/30578

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### СВИДЕТЕЛЬСТВО № 1196/2019 об аттестации МВИ

Метод измерений массовой доли гистамина в низкоаллергенных продуктах из рыбы для детского питания методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы RIDASCREEN®FAST Milk, разработанный РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию», и регламентированный в **МВИ.МН 6206-2019 «Методика выполнения измерений «Определение гистамина в низкоаллергенных продуктах из рыбы для детского питания методом ИФА»**, аттестован 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 метод измерений соответствует предъявляемым к нему метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками при принятой доверительной вероятности  $P=0,95$ :

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группа продуктов	Относительное стандартное отклонение повторяемости $\sigma_r$ , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{(TO)}$ , %	Относительная суммарная стандартная неопределенность $\frac{u_c(X)}{X}$ , %	Относительная расширенная неопределенность $U$ , %, ( $k=2, P=95\%$ )
Массовая доля гистамина	от 2,5 до 150,0 вкл.	Свежая и мороженая рыба. Готовые к употреблению рыбные продукты. Рыбные консервы	3,2	4,0	5	10

Первый заместитель директора



Н.В. Баковец

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

РУП «Научно-практический центр

Национальной академии наук

Беларуси по продовольствию»



  
З.В. Ловкис

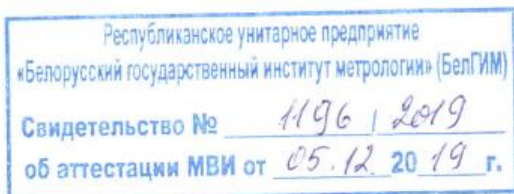
2019 г.

Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь

Методика выполнения измерений

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА В НИЗКОАЛЛЕРГЕННЫХ  
ПРОДУКТАХ ИЗ РЫБЫ ДЛЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ МЕТОДОМ ИФА

МВИ. МН 6206-2019



РАЗРАБОТЧИК

Начальник Республиканского  
контрольно-испытательного  
комплекса по качеству и  
безопасности продуктов питания  
РУП «Научно-практический центр  
Национальной академии наук  
Беларуси по продовольствию»



  
И.М. Почицкая

2019 г.

Минск, 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Вводная часть</b>		
<b>1</b>	<b>Нормативные ссылки</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Метод измерений</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Показатели точности измерений</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы</b>	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>Требования к безопасности, охране окружающей среды и квалификации операторов</b>	<b>8</b>
5.1	Требования к безопасности, охране окружающей среды	8
5.2	Требования к квалификации оператора	9
<b>6</b>	<b>Условия измерений</b>	<b>9</b>
<b>7</b>	<b>Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении</b>	<b>9</b>
<b>8</b>	<b>Условия хранения набора реагентов</b>	<b>9</b>
<b>9</b>	<b>Подготовка к выполнению измерений</b>	<b>10</b>
9.1	Отбор образцов	10
9.2	Подготовка помещения и лабораторной посуды	10
9.3	Приготовление растворов	10
9.3.1	<i>Приготовление промывочного буфера</i>	10
9.3.2	<i>Подготовка реагента для ацилирования</i>	11
9.4	Подготовка проб	11
9.4.1	<i>Пробоподготовка образцов рыбы и рыбных продуктов</i>	11
9.5	Подготовка тест-системы	11
9.5.1	<i>Предварительная подготовка и правильное обращение с тест-системой</i>	11
9.5.2	<i>Подготовка микротитровального планшета</i>	12
<b>10</b>	<b>Проведение измерений</b>	<b>12</b>
10.1	Общие сведения	12
10.2	Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа	13
10.2.1	<i>Проведение реакции ацилирования гистамина</i>	13
10.2.2	<i>Внесение ацилированных градуировочных растворов, растворов проб и растворов гистамина для контроля.</i>	13
10.2.3	<i>Инкубация планшета</i>	13
10.2.4	<i>Промывка планшета</i>	14
10.2.5	<i>Добавление раствора конъюгата</i>	14
10.2.5	<i>Повторная инкубация</i>	14
10.2.6	<i>Повторная промывка планшета</i>	14
10.2.7	<i>Внесение субстрата / хромогена</i>	14
10.2.8	<i>Завершение реакции окрашивания</i>	14
10.2.9	<i>Измерение оптической плотности</i>	14
<b>11</b>	<b>Обработка результатов измерений</b>	<b>15</b>
11.1	Расчет массовой доли гистамина	15
11.2	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	16
<b>12</b>	<b>Оформление результатов измерений</b>	<b>16</b>
12.1	Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности	16





12.2	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли гистамина с использованием значения нижней границы диапазона измерений	16
12.3	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли гистамина с использованием значения верхней границы диапазона измерений	17
<b>13</b>	<b>Контроль точности результатов измерений</b>	<b>17</b>
13.1	Оперативный контроль результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	17
13.2	Проверка приемлимости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	17
13.3	Контроль правильности результатов измерений	18
	13.3.1 <i>Образцы для контроля правильности</i>	18
	13.3.2 <i>Проведение контрольных процедур</i>	19
13.4	Контроль стабильности результатов измерений	19
	13.4.1 <i>Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта</i>	19
	13.4.2 <i>Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация контрольных карт размахов для контроля стабильности СКО повторяемости</i>	20
	13.4.3 <i>Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности</i>	20
	<b>Библиография</b>	<b>22</b>



### Вводная часть

Настоящая методика выполнения измерений (далее – МВИ) устанавливает методику выполнения измерений массовой доли гистамина в низкоаллергенных продуктах для детского питания методом иммуоферментного анализа (далее – ИФА) с использованием тест-системы RIDASCREEN®Histamin.

МВИ распространяется на следующую пищевую продукцию, предназначенную для детского питания: свежая и мороженая рыба, готовые к употреблению рыбные продукты, рыбные консервы.

МВИ позволяет выполнять измерения массовой доли гистамина в диапазоне измерений от 2,5 до 150,0 мг/кг.

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

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями 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):

ТПК 427-2012	Правила техники безопасности при эксплуатации электроустановок
СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
СТБ 1334-2003	Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия.
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 5725-3-2002	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
ГОСТ 8.010-2013	Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.2.003-91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 1770-74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ ISO 3696-2013	Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
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
ГОСТ OIML 76-1-2011	Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования испытаний

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

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящей МВИ 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 Измерения массовой доли гистамина проводят методом конкурентного иммуноферментного анализа с применением тест-системы RIDASCREEN® Histamin.

Принцип метода основан на реакции «антиген-антитело».

После пробоподготовки гистамин дериватируется путем ацилирования в N-ацил-гистамин. В конкурентном ИФА свободный ацилированный гистамин и иммобилизованный гистамин конкурируют за центры связывания антител.

После промывки вносятся ферментно маркированные вторичные антитела (конъюгат). Эти антитела связываются с комплексом антитело-гистамин. Несвязанные ферментно маркированные антитела удаляются во время промывки планшета.

В лунки дозируется субстрат и хромоген. Связанный с антителами конъюгат окрашивает хромоген в голубой цвет. Добавление стоп-реагента меняет цвет раствора на желтый. Оптическая плотность измеряется при 450 нм, она обратно пропорциональна массовой доли гистамина в исследуемых образцах.

Массовая доля гистамина в образцах определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием шести градуировочных растворов.

## 3 Показатели точности измерений

3.1 Настоящая МВИ обеспечивает получение результатов измерений массовой доли гистамина с показателями точности и расширенной неопределенностью при принятой доверительной вероятности  $P = 95\%$  в указанном выше диапазоне измерений. Данные приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости, показателя промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время-оператор» измерений массовой доли гистамина при доверительной вероятности  $P = 95\%$  и оценки неопределенности результатов измерений, влияемых в соответствии с МВИ

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группы продуктов	Относительное стандартное отклонение повторяемости, $\sigma_r$ , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности, $\sigma_{1(ГО)}$ , %	Относительная суммарная стандартная неопределенность $\frac{u_c(X)}{X}$ , %	Относительная расширенная неопределенность $U$ , %, $K=2$ , $P=95\%$
массовая доля гистамина	от 2,5 до 150,0 включ.	Свежая и мороженая рыба Готовые к употреблению рыбные продукты. Рыбные консервы	3,2	4,0	5	



Для всех видов продукции в диапазоне измерений МВИ смещение незначимо.

Указанные в таблице 1 значения метрологических характеристик МВИ получены на основании данных, полученных в ходе эксперимента, организованного и проведенного на базе лаборатории физико-химических исследований Республиканского контрольно-испытательного комплекса по качеству и безопасности продуктов питания, РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» в период с 18.05.2018 по 04.06.2018 в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2, СТБ ИСО 5725-3;
- показатели правильности – СТБ ИСО 5725-4;
- оценки неопределенности [1], [2], [3].

#### 4 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

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

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

4.1.2 Програмное обеспечение RIDA<sup>®</sup> SOFT Win версии не ниже 1.92, разработанное R-Biopharm для тест-систем Ridascreen<sup>®</sup> (далее – ПО).

4.1.3 Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ OIML 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 500 г, дискретностью не более 0,01 г.

4.1.4 Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ OIML 76-1-2011 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 220 г, дискретностью не более 0,0001 г.

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

4.1.6 рН-метр с диапазоном измерений от 0 до 14 рН и погрешностью  $\pm 0,1$  рН в комплекте с электродами.

4.1.7 Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 2500 g.

4.1.8 Лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин.

4.1.9 Лабораторный орбитальный шейкер, обеспечивающий скорость вращения до 250 об/мин.

4.1.10 Гомогенизатор, лабораторный блендер или мельница.

4.1.11 Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 37 °С с точностью  $\pm 1$  °С.

4.1.12 Холодильник бытовой для хранения тест-систем, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С.

4.1.13 Дозаторы пипеточные переменного объема с комплектом одноразовых наконечников:

- с диапазоном объемов дозирования от 20 до 200 мм<sup>3</sup> и относительной погрешностью дозирования не более 2 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм<sup>3</sup> и относительной погрешностью дозирования не более 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1000 до 5000 мм<sup>3</sup> и относительной погрешностью дозирования не более 1 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 2000 до 10000 мм<sup>3</sup> и относительной погрешностью дозирования не более 1 %;





- многоканальный (восьмиканальный) с диапазоном объемов дозирования от 30 до 300 мм<sup>3</sup> и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального  $\pm(2,0 - 1,5) \%$ .

4.1.14 Вспомогательные устройства, использование которых не является обязательным, но рекомендуемым для увеличения производительности и повышения точности анализа:

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью  $\pm 1$  °С или хладотермостат, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью  $\pm 1$  °С;

- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микроювету от 100 мм<sup>3</sup> до 350 мм<sup>3</sup>.

4.2 При выполнении измерений применяют следующие материалы.

4.2.1 Пробирки пластиковые для центрифугирования с завинчивающимися крышками типа Фалькон вместимостью 15 см<sup>3</sup> и 50 см<sup>3</sup>.

4.2.2 Пробирки стеклянные вместимостью 5 см<sup>3</sup>, П-1-5-0,1 ХС по ГОСТ 1770.

4.2.3 Пробирки стеклянные вместимостью 10 см<sup>3</sup>, П-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770.

4.2.4 Колбы мерные вместимостью 100 см<sup>3</sup>, 1000 см<sup>3</sup> 2-100-2 или 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

4.2.5 Цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup>, 2-100-2 или 3-100-2 по ГОСТ 1770.

4.2.6 Цилиндр мерный вместимостью 50 см<sup>3</sup>, 2-50-1 по ГОСТ 1770.

4.2.7 Цилиндр мерный вместимостью 1000 см<sup>3</sup>, 2-1000-1 по ГОСТ 1770.

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

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

4.2.10 Пипетки 1-2-20, 1-2-25 по ГОСТ 29169.

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

4.2.12 Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

4.2.13 Бумага фильтровальная ФБ-III по ГОСТ 12026.

4.2.14 Пленка «парафильм» или скотч.

4.2.15 Шпатели пластиковые.

4.2.16 Штативы для пробирок и одноразовых наконечников.

4.2.17 Салфетки безворсовые для чистки оптики, например Kimwipes, США или любой другой торговой марки с аналогичными свойствами.

4.2.18 Пробирки или бутылки для центрифугирования пластиковые с завинчивающимися крышками вместимостью 250 см<sup>3</sup>, например производства Corning или другого производителя, выдерживающие относительное центробежное ускорение не менее 3000 g.

4.3. При выполнении измерений применяют следующие реактивы.

4.3.1 Вода дистиллированная по ГОСТ ISO 3696.

4.3.1 Сертифицированный образец гистамина, например ГСО 8122-2002: стандартный образец состава гистамина дигидрохлорида, с массовой концентрацией гистамина  $(4,0 \pm 0,01)$  мг/см<sup>3</sup>, производства ООО НПАЦ «Эколан», г. Москва, или другой препарат с аналогичными свойствами.

4.3.2 Лабораторный детергент, например, Triton X-100.

4.3.3 Тест-система RIDASCREEN® Гистамин арт. № R1601 (на 96 лунок) или арт. № R1604 (на 46 лунок) производства фирмы R-Biopharm (Германия) – набор реактивов, градуировочных растворов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению содержания гистамина в продуктах питания методом ИФА. Состав тест-системы приведен в таблице 2.





Таблица 2 – Состав тест-системы RIDASCREEN®Гистамин для определения гистамина

Компонент набора	Количество в комплекте
Планшет для ацилирования – микротитровальный планшет без нанесения антител с 96 лунками для проведения ацилирования	1 шт.
Пробирки для ацилирования пластиковые	96 шт. (R1601) либо 48 шт. (R1604)
контроль 1 (раствор гистамина для контроля), массовая доля гистамина указана на этикетке	1 шт × 4,0 см <sup>3</sup>
контроль 2 (раствор гистамина для контроля), массовая доля гистамина указана на этикетке	1 шт × 4,0 см <sup>3</sup>
Реагент для ацилирования. Раствор готов к использованию	2 шт. × 1,5 см <sup>3</sup> (для R1601) либо 1 шт. × 1,5 см <sup>3</sup> (для R1604)
Буфер для ацилирования. Раствор готов к использованию	1 шт × 22,0 см <sup>3</sup>
Микротитровальный планшет с 96 лунками (арт. №1601) или с 48 лунками (арт. №1604), сенсibilизированный антителами к гистамину	1 шт
Градуировочные растворы с массовой долей гистамина: 0 мкг/кг (нулевой градуировочный раствор), 0,5; 1,5; 5,0; 15,0; 50,0 мкг/кг готовые к применению	6 шт × 4,0 см <sup>3</sup>
Конъюгат (антитела, конъюгированные пероксидазой). Раствор готов к использованию	1 шт × 12,0 см <sup>3</sup> (для R1601) либо 1 шт. × 6,0 см <sup>3</sup> (для R1604)
Антитела. Раствор готов к использованию	1 шт × 12,0 см <sup>3</sup> (для R1601) либо 1 шт. × 6,0 см <sup>3</sup> (для R1604)
Субстрат / Хромоген (содержит пероксид мочевины и тетраметилбензидин). Раствор готов к использованию	1 шт × 12,0 см <sup>3</sup> (для R1601) либо 1 шт. × 6,0 см <sup>3</sup> (для R1604)
Стоп-реагент (содержит 1n серную кислоту) (желтая крышка)	1 шт × 12,0 см <sup>3</sup>
50×концентрат моющего буфера	1 шт × 20,0 см <sup>3</sup>

4.4 Допускается использовать другие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы по метрологическим, техническим характеристикам и качеству не ниже указанных в разделе 4. Все средства измерения должны пройти обязательный метрологический контроль.

## 5 Требования к безопасности, охране окружающей среды и квалификации операторов

### 5.1 Требования к безопасности, охране окружающей среды

5.1.1 При выполнении работ по настоящей МВИ соблюдаются требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003, ТПК 427;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности при работе в химической лаборатории в соответствии с инструкциями, утвержденными в установленном порядке, действующими в организации.
- техники безопасности, изложенными в эксплуатационных документах средств измерений и вспомогательных устройств, применяемых при проведении измерений.



5.1.2 Стоп-реагент содержит серную кислоту, при работе с ним необходимо использовать средства индивидуальной защиты. При попадании стоп-реагента на кожу или слизистые оболочки следует немедленно промыть их большим количеством воды.

Проведение измерений по настоящей МВИ не оказывает вредного воздействия на окружающую среду.

## 5.2 Требования к квалификации операторов

К проведению работ по настоящей МВИ допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых по МВИ работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных МВИ, владеющие техникой постановки ИФА и прошедшие инструктаж по технике безопасности.

## 6 Условия измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

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

## 7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

- температура воздуха в помещении должна быть от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на которую помещают планшет, рекомендуется подкладывать под планшет теплоизоляционный материал, например, бумажное полотенце;
- при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков рекомендуется на время инкубации покрывать планшет пленкой «парафильм» или заклеивать скотчем с целью устранения возможного испарения содержимого лунок;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту МВИ, требуется помещать планшет в темное место.

## 8 Условия хранения тест-систем

Хранение тест-системы осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Замораживание реагентов тест-системы не допускается. Микротитровальный планшет с неиспользованными стрипами (лунками) хранят в плотно закрытом оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся осушителем. После использования все оставшиеся реагенты немедленно охлаждают до температуры от плюс 2 °С до плюс 8 °С. Следует, по возможности, ограничить количество извлечений из холодильника и доведения до температуры окружающей температуры тест-системы, если ИФА выполняется несколько раз. Для этого целесообразно одновременно проводить анализ не менее 10 проб (используется четыре стрипа), что уменьшает количество нагреваний тест-системы до двух раз. Тест-систему с истекшим сроком годности не используют. Замена отдельных реагентов тест-системы на реагенты из тест-системы другой партии не допускается.

Многokратное нагревание тест-системы, замена реагентов, окончание срока годности тест-системы приводят к потере чувствительности.





Бесцветный раствор субстрат / хромогена светочувствителен, поэтому следует избегать прямого попадания на него солнечных лучей.

Не следует использовать реагенты, имеющие следующие признаки порчи:

- голубая окраска раствора субстрат / хромоген до внесения его в лунки;
- оптическая плотность меньше 0,9 ( $E_{450nm} < 0,9$ ) для градуировочного раствора 1 с массовой долей гистамина 0,0 мкг/кг;

## 9 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений массовой доли гистамина в пищевой продукции выполняют следующие подготовительные работы: отбор образцов, подготовка помещения и лабораторной посуды, приготовление растворов, подготовка проб, подготовка тест-системы.

### 9.1 Отбор образцов

Отбор и образцов продукции для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы хранят в герметичных пакетах или контейнерах при температуре от плюс 2 °С до плюс 5 °С и влажности не более 80 % в течение не более 48 ч.

### 9.2 Подготовка помещения и лабораторной посуды

Для предотвращения получения ложноположительных результатов анализа вследствие возможной контаминации рабочей зоны, воздуха, рук, лабораторной посуды, оборудования, воды, реагентов и анализируемых образцов гистамином, необходимо:

- осуществлять пробоподготовку и постановку иммуноферментного анализа в разных помещениях;
- выполнять анализ в разовых резиновых перчатках;
- тщательно очищать оборудование от остатков предыдущей пробы перед анализом последующей во избежание перекрестного загрязнения.

Сильно загрязненную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе лабораторного детергента промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой два раза и высушивают.

#### **Запрещается:**

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

### 9.3 Приготовление растворов

Реагенты готовят в отдельном помещении, чтобы избежать необратимого загрязнения их материалом проб.

#### 9.3.1 Приготовление раствора промывочного буфера

Промывочный буфер поставляется в концентрированном виде (50-кратный концентрат). Перед разбавлением промывочного буфера растворяют кристаллы, которые могут образовываться во флаконе с концентратом при его хранении. Для этого помещают флакон в водяную баню при температуре 37 °С до растворения кристаллов.

Для приготовления раствора промывочного буфера отмеренную цилиндром аликвоту концентрата промывочного буфера объемом 20 см<sup>3</sup> приливают в колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> и добавляют отмеренную цилиндром вместимостью 1000 см<sup>3</sup> дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 49 раз больше, чем объем концентрата промывочного буфера (например 20 см<sup>3</sup> концентрированного промывочного буфера плюс 980 см<sup>3</sup> дистиллированной воды). Полученный раствор промывочного буфера может храниться при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 1 мес.



### 9.3.2 Подготовка реагента для ацилирования

Реагент для ацилирования поставляется в готовом для использования виде, точка замерзания составляет плюс 18,5 °С. Для дальнейшего использования реагент для ацилирования должен быть в жидком, гомогенном виде без кристаллов. Реагент может храниться при температуре от 20 °С до 25 °С либо должен быть доведен до температуры от 20 °С до 25 °С перед его использованием.

### 9.4 Подготовка проб

При пробоподготовке соблюдают условия, изложенные в п. 9.2. Пробирки для ацилирования и лунки для ацилирования предназначены для однократного использования, чтобы избежать контаминации. Для подготовки проб следует использовать только пластиковые пробирки.

При пробоподготовке важно соблюдать условия, изложенные в п. 9.2. Отобранные по п. 9.1 образцы измельчают с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или блендера лабораторного.

При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения.

#### 9.4.1 Подготовка проб сырой рыбы и рыбных консервов.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см<sup>3</sup>. В каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 9,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Пробирки закрывают завинчивающимися крышками и тщательно перемешивают на лабораторном вортексе в течении 30 с при 1800 об/мин или интенсивно встряхивают вручную переворачивая для равномерного распределения пробы в дистиллированной воде.

Центрифугируют при относительным центробежным ускорением от 2500 до 3000 g в течение 5 мин при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

Удаляют верхний слой жира. Аликвоту надосадочной жидкости в количестве 1 см<sup>3</sup> переносят в чистую пробирку и добавляют 9 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе. Аликвоту полученного раствора в количестве 200 мм<sup>3</sup> переносят в новую чистую пробирку и добавляют 9,8 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Используют по 100 мм<sup>3</sup> на пробирку для ацилирования либо лунку планшета для ацилирования.

#### 9.4.2 Подготовка проб готовых к употреблению рыбных продуктов.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 250 см<sup>3</sup>. В каждую пробирку добавляют отмеренные мерным цилиндром 200,0 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Пробирки закрывают завинчивающимися крышками и тщательно перемешивают на лабораторном шейкере в течении 15 мин при 150-200 встряхиваний в мин для равномерного распределения пробы в дистиллированной воде.

Центрифугируют при относительным центробежным ускорением от 2500 g до 3000 g в течение 5 мин при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

Удаляют верхний слой жира. Аликвоту надосадочной жидкости в количестве 200 мм<sup>3</sup> переносят в новую чистую колбу и добавляют 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Повторяют процедуру встряхивания на шейкере. Используют по 100 мм<sup>3</sup> на пробирку для ацилирования либо лунку планшета для ацилирования.

### 9.5 Подготовка тест-системы

#### 9.5.1 Предварительная подготовка и правила обращения с тест-системой

Перед началом работы тест-систему извлекают из холодильника и выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение не менее 1 ч, не открывая упаковку микротитровального планшета. Доводят температуру остальных реагентов до температуры





от плюс 20 °С до плюс 25 °С. После окончания анализа реагенты тест-системы немедленно помещают в холодильник.

Не допускается высыхание микролунок между стадиями ИФА.

Воспроизводимость в любом ИФА во многом зависит от правильности промывки микротитровальных планшетов. Необходимо тщательно следовать процедуре промывки, как описано в п 10.2.3.

На время инкубации рекомендуется покрывать микротитровальный планшет пленкой типа «парафильм».

При работе следует исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты тест-системы. Реакция после внесения субстрата / хромогена должна проводиться в темноте.

Перед использованием жидкие реагенты перемешивают путем осторожного вращения флаконов в течение 10-15 с. Для этих целей можно использовать вортекс, настроенный на минимальные обороты. Не допускается переливать обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемых при проведении измерений согласно разделу 10.

### 9.5.2 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 12 + 2 \cdot N_{smp}, \quad (1)$$

где  $N_{smp}$  – количество анализируемых образцов;  
12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленный 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.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят согласно схеме, предлагаемой программным обеспечением RIDA<sup>®</sup> SOFT Win, с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и образцов. Позиции градуировочных растворов и анализируемых образцов, названия образцов, коэффициент разбавления каждой пробы заносятся в соответствующие окна программы.

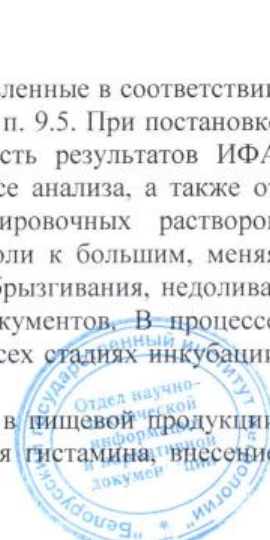
Не рекомендуется одновременно использовать более четырех стрипов. Если необходимо провести измерение более 10 образцов, ИФА выполняется несколько раз.

## 10 Порядок выполнения измерений

### 10.1 Общие сведения

**10.1.1** Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.4. Компоненты тест-системы подготавливают в соответствии с п. 9.5. При постановке ИФА соблюдают условия, изложенные в разделе 7. Прецизионность результатов ИФА существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа, а также от правильного дозирования всех жидкостей. Дозирование градуировочных растворов необходимо проводить, начиная от меньших значений массовой доли к большим, меняя наконечники дозаторов. При работе с дозаторами во избежание разбрызгивания, недолива, недобора жидкостей соблюдают требования эксплуатационных документов. В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета. На всех стадиях инкубации избегают воздействия прямого солнечного света.

**10.1.2** При выполнении измерений массовой доли гистамина в пищевой продукции выполняют следующие операции: проведение реакции ацилирования гистамина, внесение



градуировочных растворов и растворов проб, инкубация микротитровального планшета, промывка микротитровального планшета, добавление раствора конъюгата и повторная инкубация микротитровального планшета, повторная промывка микротитровального планшета, внесение субстрата / хромогена, завершение реакции окрашивания, измерение оптической плотности.

## **10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа**

### **10.2.1 Проведение реакции ацилирования гистамина.**

При постановке реакции требуется аккуратное внесение реагентов в лунки, избегая разбрызгивания.

Анализ всех градуировочных растворов, растворов гистамина для контроля и растворов проб проводят в двух повторностях. При использовании тест-системы арт. R1604 на 48 лунок, в планшете для ацилирования используют только 48 лунок (не все 96), т.к. микротитровальный планшет для ИФА из данной тест-системы содержит 48 лунок. Также реакцию ацилирования можно проводить в пластиковых пробирках, входящих в состав тест-системы, разместив необходимое количество пробирок в планшете для ацилирования.

В протокол вносят позиции градуировочных растворов и проб.

В соответствующие пробирки / лунки планшета для ацилирования вносят по 100 мм<sup>3</sup> градуировочных растворов, растворов гистамина для контроля и растворов проб.

В каждую пробирку / лунку планшета для ацилирования вносят по 25 мм<sup>3</sup> реагента для ацилирования

В каждую пробирку / лунку планшета для ацилирования вносят по 200 мм<sup>3</sup> буфера для ацилирования, осторожно перемешивают содержимое планшета и инкубируют в течение 15 минут при температуре от 20 °С до 25 °С.

Для постановки ИФА используют 25 мм<sup>3</sup> соответствующей пробы.

### **10.2.2 Внесение градуировочных растворов и растворов проб**

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.5.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 25 мм<sup>3</sup> каждого ацилированного градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельные лунки в двух повторностях, внесение производится в порядке возрастания значений массовой доли градуировочных растворов (т.е. 0; 0,5; 1,5; 5,0; 15,0; 50,0 мкг/кг). В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 25 мм<sup>3</sup> двух параллельных ацилированных проб каждого образца. В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты ацилированных растворов гистамина для контроля с известным содержанием анализируемого вещества.

Во все лунки микротитровального планшета добавляют по 100 мм<sup>3</sup> раствора антител. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 с.

### **10.2.3 Инкубация планшета**

Осторожно перемешивают содержимое планшета. Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 40 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 40 мин в защищенном от сквозняка и света месте при условиях, указанных в разделе 7.

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





энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой.

#### 10.2.4 Промывка планшета

Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по  $250 \text{ мм}^3$  раствора промывочного буфера, приготовленного по п. 9.3.1, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Допускается проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – от 3 до 4, объем заливаемого моющего раствора –  $250 \text{ мм}^3$ .

После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого сухим листом фильтровальной бумаги.

#### 10.2.5 Добавление раствора конъюгата

Во все лунки микротитровального планшета добавляют по  $100 \text{ мм}^3$  раствора конъюгата. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 с.

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  до плюс  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 20 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 20 мин в защищенном от сквозняков и света месте при условиях, указанных в разделе 7.

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

#### 10.2.6 Повторная промывка планшета

Повторяют процедуру, описанную в п. 10.2.4

#### 10.2.7 Внесение субстрата / хромогена

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора во все лунки микротитровального планшета добавляют по  $100 \text{ мм}^3$  раствора субстрата / хромогена. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 с.

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  до плюс  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 15 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7. Хромоген светочувствителен, поэтому на данном этапе особое внимание следует уделить тому, чтобы планшет инкубировался в защищенном от света месте (в темноте).

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении).

#### 10.2.8 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в каждую лунку вносят по  $100 \text{ мм}^3$  стоп реагента и аккуратно круговыми движениями перемешивают содержимое лунок.

Безворсовой салфеткой вытирают нижнюю наружную поверхность лунок планшета.

#### 10.2.9 Измерение оптической плотности

В течение 10 мин после добавления стоп-реагента необходимо измерить оптическую плотность лунок планшета. Оптическую плотность измеряют с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора. При работе фотометра следует исключить прямое



попадание солнечных лучей на прибор, так как это может привести к неверным результатам измерения. Управление фотометром может осуществляться через интерфейс ПО по 4.1.2.

## 11 Обработка результатов измерений

### 11.1 Расчет массовой доли гистамина

Программное обеспечение производит обработку результатов измерений оптической плотности, переданных с фотометра автоматически или введенных оператором вручную с помощью интерфейса программного обеспечения:

- Построение градуировочной зависимости массовая доля гистамина – относительная оптическая плотность.

- Расчет фактического значения массовой доли гистамина в пробах на основании рассчитанного значения относительной оптической плотности и задаваемого оператором фактора разбавления.

Для получения результата измерения массовой доли гистамина в пробах задают следующие настройки:

- Последовательно открывают следующие окна ПО: Food and Feed→Allergen→Histamin.met→Edit→Method. Оставляют все предустановленные настройки файла Histamin.met, за исключением:

- Количество параллельных определений образцов (Samples→Replicates) настраивают на единицу – 1.

- Количество параллельных определений градуировочных растворов (Standarts→Replicates) настраивают на два – 2.

Для сырой рыбы и рыбных консервов фактор разбавления уже установлен в настройках файла Histamin.met – 500, для готовых к употреблению рыбных продуктов устанавливают фактор разбавления 200 000.

При оценке значений измеренной оптической плотности руководствуются следующими правилами:

- Оптическая плотность в лунке со стандартом 1 (0 мкг/кг) не должна быть меньше 0,9, в противном случае это является признаком порчи реагентов. В данном случае анализ необходимо повторить с другим тест-набором реагентов.

- В случае, если результаты измерения массовой доли гистамина находятся вне диапазона градуировки, дальнейшую обработку результатов измерений не производят, а представляют окончательный результат измерений согласно п. 12.2 или 12.3. Экстраполяция результатов вне диапазона градуировочного графика не допускается.

Результаты измерений контрольных растворов гистамина обрабатывают согласно инструкции изготовителя тест-системы.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.2

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

где  $X_1, X_2$  – результаты двух измерений массовой доли гистамина в параллельных пробах, мкг/кг, полученные при помощи программного обеспечения.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Промежуточные и окончательные результаты после обработки регистрируют в электронном виде или на бумажном носителе.





### 11.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

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

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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (3)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое  $\bar{X}$ , рассчитанное по формуле (2).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (4)$$

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

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

При невыполнении условия (3) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

При повторном невыполнении условия (3) в лаборатории проводятся анализ причин, приводящих к неудовлетворительным результатам измерения, и корректирующие действия для их устранения.

## 12 Оформление результатов измерений

### 12.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений массовой доли гистамина, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(\bar{X})), \text{ мг/кг} \quad (5)$$

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

где  $\bar{X}$  – результат измерений массовой доли гистамина, полученный в соответствии с настоящей МВИ и рассчитанный согласно разделу 11, мг/кг;

$U(\bar{X})$  – расширенная неопределенность результатов измерений, мг/кг.

Расширенную неопределенность результата измерений  $U(\bar{X})$ , мг/кг, рассчитывают по формуле

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

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

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

### 12.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли гистамина с использованием значения нижней границы диапазона измерений



Если окончательный результат измерений  $\bar{X}$  оказывается меньшим, чем значение нижней границы диапазона измерений, равное 2,5 мг/кг, то дается односторонняя оценка массовой доли гистамина в образце с использованием предела измерений

*менее  $X_{DL}$*

где  $X_{DL}$  – значение нижней границы диапазона измерений, приведенное выше.

### **12.3 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли гистамина с использованием значения верхней границы диапазона измерений**

Если окончательный результат измерений  $\bar{X}$  оказывается большим, чем значение верхней границы диапазона измерений, равное 150,0 мг/кг, то дается односторонняя оценка массовой доли гистамина в образце с использованием верхней границы диапазона измерений

*более  $X_{HL}$*

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

## **13 Контроль точности результатов измерений**

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

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

### **13.1 Оперативный контроль результатов измерений, полученных в условиях повторяемости**

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения массовой доли гистамина при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 11.2.

### **13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности**

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

Проводят измерения согласно разделу 10 в условиях промежуточной прецизионности и получают результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.2.

Рассчитывают среднее арифметическое результатов измерений массовой доли гистамина  $\bar{\bar{X}}$ , мг/кг, согласно формуле

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (7)$$

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений  $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$ , полученными в условиях промежуточной прецизионности, значение, которого сравнивают с абсолютным значением критической разности (норматив контроля промежуточной





прецизионности)  $CD_{abs}$ . Если выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abs}, \quad (8)$$

то оба конечных результата считаются приемлемыми и общее среднее значение, рассчитанное по формуле (7), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

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

где  $\bar{X}$  – среднее арифметическое значение результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, мг/кг;

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

$$CD = \sqrt{r_{l(t_0)}^2 - \frac{r^2}{2}}, \quad (10)$$

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

$r_{l(t_0)}$  – относительное значение предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «оператор-время», %, при  $P = 95\%$ , приведенное в таблице 3.

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

Виды продукции	Предел повторяемости $r$ , %	Предел промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «оператор-время» $r_{l(t_0)}$ , %	Норматив контроля правильности $K_{omn}$ , %
Свежая и мороженая рыба Готовые к употреблению рыбные продукты. Рыбные консервы	9,0	11,2	9,6

При невыполнении условия (8) проводят повторные измерения согласно разделу 10. При повторном невыполнении условия (8) в лаборатории проводятся анализ причин, приводящих к неудовлетворительным результатам измерения, и корректирующие действия для их устранения.

### 13.3 Контроль правильности результатов измерений

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

- при внедрении методики;
- при значимых изменениях в условиях измерений (новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.).

Контроль правильности измерений массовой доли гистамина производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением массовой доли вещества (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок гистамина. Неопределенность аттестованного значения массовой доли гистамина в образцах для контроля не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

#### 13.3.1 Образцы для контроля правильности

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая доля гистамина в которых менее предела измерения данной методикой, в которую внесена добавка раствора гистамина. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками



(аликвотами) проб. Значение массовой доли гистамина в пробе с добавкой  $X_{am}$ , мг/кг, рассчитывается по формуле

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (11)$$

где  $C_{ST}$  – массовая концентрация раствора гистамина, мкг/см<sup>3</sup>;  
 $V_{ST}$  – объем раствора гистамина, см<sup>3</sup>;  
 $m$  – масса навески пробы, г.

Величина массовой доли гистамина в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Для внесения добавки используют раствор, приготовленный из препарата гистамина в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией.

### 13.3.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений образцов для контроля в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой доли гистамина в образце для контроля  $\bar{X}_K$ , мг/кг, рассчитанный по формуле

$$\bar{X}_K = \frac{\sum X_i}{n}, \quad (12)$$

где  $X_i$  –  $i$ -ый результат измерений массовой доли гистамина в образце для контроля, мг/кг;  
 $n$  – число измерений (рекомендуется ( $n \geq 6$ )).

Проводят контроль условия повторяемости по п. 11.2, используют вместо относительного предела повторяемости  $\Gamma$  приведенного в таблице 3, значение  $1,43 \cdot r$ .

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_K - X_{Gl}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \bar{X}_K, \quad (13)$$

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

$X_{Gl}$  – расчетное значение массовой доли гистамина в образце для контроля, мг/кг.

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

## 13.4 Контроль стабильности результатов измерений

### 13.4.1 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта

С помощью данных карт контролируют (далее КК) 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 карт должны осуществляться в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 (раздел 6).

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

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

Для построения и ведения Recovery-карт используются образцы для контроля.





представляющие собой рабочие пробы с добавками стандартного раствора. Предварительно установленная массовая доля гистамина в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения, декларируемого производителем тест-системы. Рекомендуется вносить добавку гистамина в образцы для контроля на уровне массовой доли исследуемого вещества в рабочих пробах.

### 13.4.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация контрольных карт размахов для контроля стабильности СКО повторяемости

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

- Центральная линия

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (14)$$

где  $\sigma_r$  – относительное СКО повторяемости, %, экспериментально установленное при валидации методики измерений.

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (15)$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (16)$$

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

Ведение карт предусматривает набор данных  $X_1, X_2$  при выполнении испытаний образцов для контроля в условиях повторяемости в полном соответствии с МВИ, расчет фактических относительных значений размаха  $W$  по формуле (17), оформление Листа данных контрольных карт и нанесение данных на эти карты.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (17)$$

где  $X_1, X_2$  – значения результатов измерений в условиях повторяемости.

Оценку СКО повторяемости  $S_r$  за контролируемый период получают по формуле

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{W_i}{N}}{d_2}, \quad (18)$$

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

$d_2$  – коэффициент,  $d_2=1,128$ .

### 13.4.3 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

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (19)$$

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 исследуемого вещества по формуле

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (20)$$



где  $X_i$  – значения массовой доли гистамина в пробе с добавкой, полученное для  $i$ -го измерения, мг/кг;

$X_{exp}$  – рассчитанное значение массовой доли гистамина в пробе с добавкой, мг/кг.

- Предупреждающие границы

$$UCL = Rec + 2 \cdot S_{REC}; \quad LCL = Rec - 2 \cdot S_{REC}; \quad (21)$$

- Границы регулирования

$$UCL = Rec + 3 \cdot S_{REC}; \quad LCL = Rec - 3 \cdot S_{REC}, \quad (22)$$

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

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}}, \quad (23)$$

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

Ведение карт предусматривает набор данных единичных измерений  $X$ , при выполнении испытаний образец для контроля в соответствии с МВИ, расчета фактических значений извлечения  $Rec_i$  по формуле (20), оформлении Листа данных контрольных карт и нанесения данных на эти карты.





## Библиография

В настоящем МВИ использованы ссылки на следующие документы:

- [1] ISO 21748:2017 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation
- [2] Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК  
Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях – 2-е издание, 2000, перевод с английского Р.Л. Кадиса, Г.Р. Нежиховского, В.Б. Симины под общей редакцией Л.А. Конопелько, Санкт-Петербург: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, 2002
- [3] ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008 Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

