

ДЗЯРЖАУНЫ КАМІТЭТ ПА СТАНДАРТЫЗАЦЫІ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства
"БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАУНЫ
ІНСТЫТУТ МЕТРАЛОГІІ"
- 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
унн 100055197

05.12.2019 г. № 28-12/30575

На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 1193/2019 об аттестации МВИ

Метод измерений массовой доли белка коровьева молока в безмолочных низкоаллергенных продуктах 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 6203-2019 «Методика выполнения измерений «Определение молока в безмолочных низкоаллергенных продуктах 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 $P=0,95$:

Относительные значения показателей повторяемости и показателя промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время-оператор» измерений массовой доли белка коровьева молока при доверительной вероятности $P = 95\%$

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группа продуктов	Относительное стандартное отклонение повторяемости $\sigma_r, \%$	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{(T0)}, \%$
Массовая доля белка коровьева молока	от 2,5 до 67,5 вкл.	Пищевая продукция, предназначенная для детского питания: пищевая продукция, относящаяся к пищевой продукции специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная изготовителями, как не содержащая коровье молоко или с низким содержанием коровьева молока: (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия)	4,0	5,3

Оценки неопределенности результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группа продуктов	Относительная суммарная стандартная неопределенность $\frac{m_c(X_i)}{X}$, %	Относительная расширенная неопределенность U , %, (k=2, P=95%)
Массовая доля белка коровьего молока	от 2,5 до 67,5 вкл.	Пищевая продукция, предназначенная для детского питания: пищевая продукция, относящаяся к пищевой продукции специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная изготовителями, как не содержащая коровье молоко или с низким содержанием коровьего молока: (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия)	7	14

Первый заместитель директора



Н.В. Баковец

59646

СОДЕРЖАНИЕ

	Вводная часть	
1	Нормативные ссылки	4
2	Показатели точности измерений	5
3	Метод измерений	6
4	Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы	7
5	Требования к безопасности, охране окружающей среды, требования к квалификации операторов	9
	5.1 Требования к безопасности, охране окружающей среды	9
	5.2 Требования к квалификации операторов	10
6	Условия измерений	10
7	Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении	10
8	Условия хранения тест-систем	10
9	Подготовка к выполнению измерений	11
	9.1 Отбор образцов	11
	9.2 Подготовка помещения и лабораторной посуды	11
	9.3 Приготовление растворов	11
	9.3.1 Приготовление 1 М раствора натрия гидроксида (NaOH)	11
	9.3.2 Приготовление 1 М раствора кислоты соляной (HCl)	12
	9.3.3 Приготовление буфера для экстракции аллергена	12
	9.3.4 Приготовление буфера для экстракции аллергена содержащего добавку 1 (буфер А-АЕР)	12
	9.3.5 Приготовление раствора экстрактора 2	12
	9.3.6 Приготовление раствора конъюгата антител с пероксидазой	12
	9.3.7 Приготовление раствора промывочного буфера	13
	9.4 Подготовка проб	13
	9.5 Подготовка тест-системы	14
	9.5.1 Предварительная подготовка и правильное обращение с тест-системой	14
	9.5.2 Подготовка микротитровального планшета	14
10	Порядок выполнения измерений	15
	10.1 Общие сведения	15
	10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа	15
	10.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб	15
	10.2.2 Инкубация планшета	15
	10.2.3 Промывка планшета	15
	10.2.4 Добавление раствора конъюгата	15
	10.2.5 Повторная инкубация	15
	10.2.6 Повторная промывка планшета	16
	10.2.7 Внесение субстрата / хромогена	16
	10.2.8 Завершение реакции окрашивания	16
	10.2.9 Измерение оптической плотности	17
11	Обработка результатов измерений	17
	11.1 Расчет массовой доли белка коровьего молока	17
	11.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	18



12	Оформление результатов измерений	18
12.1	Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности	18
12.2	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли белка коровьего молока с использованием предела обнаружения	18
12.3	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли белка коровьего молока с использованием значения верхней границы диапазона измерений	19
13	Контроль точности результатов измерений	19
13.1	Оперативный контроль результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	19
13.2	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	19
13.3	Контроль правильности результатов измерений	19
	13.3.1 <i>Образцы для контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой</i>	20
	13.3.2 <i>Проведение контрольных процедур</i>	21
13.4	Контроль стабильности результатов измерений	22
	13.4.1 <i>Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта</i>	22
	13.4.2 <i>Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация контрольных карт размахов для контроля стабильности СКО повторяемости</i>	22
	13.4.3 <i>Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности</i>	23
	Библиография	24



Вводная часть

Настоящая методика выполнения измерений (далее – МВИ) устанавливает методику выполнения измерений массовой доли белка коровьего молока в безмолочных низкоаллергенных продуктах для детского питания методом иммуноферментного анализа (далее – ИФА) с использованием тест-системы RIDASCREEN®FAST Milk.

МВИ распространяется на следующую пищевую продукцию, предназначенную для детского питания: пищевую продукцию, относящуюся к пищевой продукции специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированную изготовителями, как несодержащую коровье молоко или пищевую продукцию с низким содержанием коровьего молока (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия для детского питания).

При проведении измерений массовой доли белка коровьего молока применяется тест-система RIDASCREEN®FAST Milk (далее – тест-система). Тест-система использует градуировочные растворы, приготовленные с применением эталонного образца цельного сухого молока NIST Standard Reference Material 1549a (whole milk powder.). Измерение массовой доли белка коровьего молока согласно данной МВИ основано на определении казеинов и бета-лактоглобулинов белка коровьего молока (см. раздел 3), поэтому результат измерений массовой доли белка коровьего молока выражается в пересчете на белок, состав которого соответствует сухому коровьему молоку. В пищевой продукции с иным составом белков молока, например в продукции, содержащей значительные количества молочной сыворотки или казеинатов, результат измерений, полученный согласно данной МВИ, не будет соответствовать фактическому содержанию белка коровьего молока.

Диапазон измерений МВИ составляет от 2,5 до 67,5 мг/кг. Предел измерений (LOQ) определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

Настоящая МВИ 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):

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.



ГОСТ 12.2.003-91	Методики выполнения измерений. Основные положения Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
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 3118-77	Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
ГОСТ 4328-72	Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
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 R 76-1-2011	Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования испытаний
ГОСТ 34100.3-2017/ ISO/IEC Guide 98-3:2008	Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.

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 Показатели точности измерений

2.1 Настоящая МВИ обеспечивает получение результатов измерений массовой доли белка коровьего молока в безмолочных низкоаллергенных продуктах для детского питания методом ИФА с использованием тест-системы RIDASCREEN®FAST Milk с показателями точности и расширенной неопределенностью при принятой доверительной вероятности $P = 95\%$ в диапазоне измерений, указанных в таблицах 1 и 2.



Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и показателя промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время-оператор» измерений массовой доли белка коровьего молока при доверительной вероятности $P = 95\%$

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группы продуктов	Относительное стандартное отклонение повторяемости, $\sigma_r, \%$	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}, \%$
Массовая доля белка коровьего молока	от 2,5 до 67,5 включ.	Пищевая продукция, предназначенная для детского питания: пищевая продукция, относящаяся к пищевой продукции специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная изготовителями, как не содержащая коровье молоко или с низким содержанием коровьего молока: (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия)	4,0	5,3

Для всех видов продукции в диапазоне измерений МВИ смещение незначимо.

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

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

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группы продуктов	Относительная суммарная стандартная неопределенность $\frac{u_c(X)}{X}, \%$	Относительная расширенная неопределенность $U, \%$, $k = 2, P = 95\%$
Массовая доля белка коровьего молока	от 2,5 до 67,5 включ.	Пищевая продукция, предназначенная для детского питания: пищевая продукция, относящаяся к пищевой продукции специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная изготовителями, как не содержащая коровье молоко или с низким содержанием коровьего молока: (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия)	7	14

Указанные в таблицах 1, 2 значения метрологических характеристик МВИ получены на основании данных, полученных в ходе эксперимента, проведенного в 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 29.11.2017 г. по 07.09.2018 г. в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2, СТБ ИСО 5725-3;
- показатели правильности – СТБ ИСО 5725-4;
- оценки неопределенности – ГОСТ 34100.3, [1], [2].



3 Метод измерений

3.1 Измерения массовой доли белка коровьего молока проводят методом прямого иммуноферментного анализа с применением тест-системы RIDASCREEN®FAST Milk.

Принцип метода основан на реакции «антиген-антитело». Для детекции используются специфические антитела против казеина и β-лактоглобулина в качестве захватывающих антител. Лунки микротитровального планшета покрыты обоими видами антител. Градуировочные растворы и экстракты образцов инкубируют в течение 10 мин. В ходе реакции антигены (казеин и β-лактоглобулин) растворов проб или градуировочных растворов взаимодействуют с антителами, адсорбированными на поверхности лунок микротитровального планшета, что приводит к образованию комплекса антиген-антитело. Несвязанные антигены удаляются на стадии промывки, затем вносится смесь ферментно маркированных антител (конъюгат) анти-казеина и анти-β-лактоглобулина и инкубируют в течение еще 10 мин. Эти конъюгаты связываются с комплексом молочных белков-антител на планшете (сэндвич иммуно-ферментный анализ). Несвязавшийся конъюгат фермента затем удаляется с помощью промывки. Субстрат / хромоген добавляют в лунки и инкубируют в течение 10 мин. Связанный фермент окрашивает субстрат / хромоген в голубой цвет. Добавление стоп-реагента (раствора серной кислоты) ингибирует ферментативную реакцию и вызывает изменение цвета на желтый. Измерение оптической плотности выполняется с помощью микропланшетного фотометра в течение 10 мин после внесения стоп-реагента при длине волны 450 нм. Полученные значения оптической плотности прямо пропорциональны массовой доле белка коровьего молока в исследуемых образцах.

Массовая доля белка коровьего молока в образцах определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием пяти градуировочных растворов.

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®SOFT Win версии не ниже 1.92, разработанное R-Biopharm для тест-систем Ridascreen® (далее – ПО).

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

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

4.1.5 Термометр лабораторный частичного погружения класса точности I дискретность 1 °C по ГОСТ 28498.

4.1.6 pH-метр с диапазоном измерений от 0 до 14 pH и погрешностью $\pm 0,1$ pH 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 до 300 об/мин.

4.1.10 Гомогенизатор, лабораторный блендер или мельница.

4.1.11 Две бани водяные, обеспечивающие поддержание температуры от плюс 37 °C до плюс 100 °C с точностью ± 2 °C.



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 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 2 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1000 до 5000 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 1 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 2000 до 10000 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 1 %;
- многоканальный (восьмиканальный) с диапазоном объемов дозирования от 30 до 300 мм³ 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 ± 1 °С или хладотермостат, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью ± 1 °С;
- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микроювету от 100 мм³ до 350 мм³.

4.2 При выполнении измерений применяют следующие материалы:

4.2.1 Пробирки пластиковые для центрифугирования с завинчивающимися крышками типа Фалькон вместимостью 15 и 50 см³.

4.2.2 Пробирки стеклянные вместимостью 5 см³, П-1-5-0,1 ХС по ГОСТ 1770.

4.2.3 Пробирки стеклянные вместимостью 10 см³, П-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770.

4.2.4 Колбы мерные вместимостью 100 и 1000 см³ 2-100-2 или 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

4.2.5 Цилиндр мерный вместимостью 100 см³, 2-100-2 или 3-100-2 по ГОСТ 1770.

4.2.6 Цилиндр мерный вместимостью 50 см³, 2-50-1 по ГОСТ 1770.

4.2.7 Цилиндр мерный вместимостью 1000 см³, 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 Микротитровальный инертный планшет без покрытия антителами с низким связыванием, например, производства Greiner Bio-One, Frickenhausen, Германия, кат. 655101.

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

4.2.19 Средства индивидуальной защиты

4.3. При выполнении измерений применяют следующие реактивы:

4.3.1 Вода дистиллированная по ГОСТ ISO 3696.



4.3.1 RIDA[®] Extractor 2 (арт. R4613, пр-ва R-Biopharm) для подготовки проб.

4.3.2. Натрия гидроксид (NaOH) х.ч. по ГОСТ 4328.

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

4.3.4 Спирт этиловый ректификованный первого сорта с объемной долей этилового спирта не менее 96 % по СТБ 1334.

4.3.5 Молоко сухое обезжиренное или цельное с аттестованным значением массовой доли белка коровьего молока, например, Reference Material muva-MP-0212 Spray Dried Skimmed Milk Powder с массовой долей белка коровьего молока (38,37 ± 0,07) %.

4.3.6 Лабораторный детергент, например, Triton X-100.

4.3.7 Тест-система RIDASCREEN[®]FAST Milk арт. № R4652 производства фирмы R-Biopharm, Германия, арт. №: R4652 (далее тест-система) – набор реактивов, градуировочных растворов и микротитровальный планшет, предназначенные для выполнения измерений массовой доли белка коровьего молока в пищевой продукции методом ИФА. Состав тест-системы приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав тест-системы RIDASCREEN[®]FAST Milk для определения массовой доли белка коровьего молока

Компонент	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет с 48 лунками, сенсibilизированный антителами к белку молока (8 стрипов по 8 лунок)	1 шт
Градуировочные растворы с массовой долей белка коровьего молока: 0 (нулевой градуировочный раствор); 2,5; 7,5; 22,5 и 67,5 мг/кг ¹⁾ , готовые к применению, с прозрачными крышками	5 шт × 1,3 см ³
Концентрат конъюгата 11×кратный (антитела, конъюгированные пероксидазой хрена) (красная крышка)	1 шт × 0,7 см ³
Добавка 1 (синяя крышка)	1 шт × 2,0 г
Концентрат Extractor2 2×кратный (содержит β-меркаптоэтанол) (синяя крышка)	3 шт × 30 см ³
Субстрат / Хромоген (содержит пероксид мочевины и тетраметилбензидин) (коричневая крышка)	1 шт × 10,0 см ³
Буфер для разведения концентрата конъюгата, готовый к применению (черная крышка)	1 шт × 7,0 см ³
Стоп-реагент (содержит 1n серную кислоту) (желтая крышка)	1 шт × 14,0 см ³
10×концентрат буфера для экстракции аллергена (зеленая крышка)	1 шт × 100,0 см ³
10×концентрат моющего буфера (коричневая крышка)	1 шт × 100,0 см ³
<p>¹⁾ Градуировочным растворам приписываются условные значения массовой доли белка коровьего молока, соответствующие массовой доле белка коровьего молока в исходной измеряемой пробе образца. Действительные значения величин концентраций градуировочных растворов, входящих в комплект поставки, учитывают фактический коэффициент разбавления пробы, равный 100, который получают в результате процедуры пробоподготовки. Этот факт позволяет находить значение массовой доли белка коровьего молока в анализируемом образце по результату измерения массовой доли белка коровьего молока в подготовленном растворе пробы, полученному сразу по градуировочной кривой.</p>	

4.4 Допускается использовать другие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы с метрологическими, техническими характеристиками и качеством не ниже указанных в разделе 4.



5 Требования к безопасности, охране окружающей среды, требования к квалификации операторов

5.1 Требования к безопасности, охране окружающей среды

5.1.1 При выполнении измерений массовой доли белка коровьего молока согласно настоящей МВИ соблюдают следующие требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;

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

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.

При подготовке проб рекомендуется работать под вытяжной системой, поскольку RIDA[®] Extractor 2 содержит β -меркаптоэтанол (неприятно пахнущее вещество).

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 методике работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных МВИ, владеющие техникой постановки ИФА.

6 Условия измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- атмосферное давление от 84,0 до 106,7 кПа;
- 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-системы

Хранение тест-системы осуществляется в холодильнике при температуре от 2 °С до 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 2 °С до 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 семи проб (используется три 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.

Многочасовое 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 0,8 ($E_{450nm} < 0,8$) для градуировочного раствора 5 с массовой долей белка коровьего молока 67,5 мг/кг.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

Отбор и образцов продукции для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы хранят в герметично укуренных пакетах при температуре от плюс 2 °С до плюс 25 °С и относительной влажности не более 80 % в течение не более 2 нед.

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 белком молока, необходимо:

- осуществлять пробоподготовку и постановку ИФА в разных помещениях;
- промывать поверхности рабочей зоны, все рабочие поверхности лабораторного оборудования (мельницы, гомогенизатора и т.д.) и стеклянную посуду 80%-м раствором этилового спирта перед началом анализа, после каждой процедуры и перед началом последующих анализов;
- тщательно очищать оборудование от остатков предыдущей пробы перед анализом последующей во избежание перекрестного загрязнения.

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 загрязнения их материалом проб.



9.3.1 Приготовление раствора натрия гидроокиси (NaOH) с концентрацией 1 моль/дм³

Навеску гидроокиси натрия массой 40,00 г, взвешенную с точностью 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, добавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, перемешивают до полного растворения и доводят до метки дистиллированной водой. После приготовления раствора его переносят в полиэтиленовую или фторопластиковую посуду и хранят при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С не более 3 мес.

9.3.2 Приготовление раствора кислоты соляной (HCl) с концентрацией 1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ добавляют примерно 200 см³ дистиллированной воды. Затем тонкой струей вливают 85 см³ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,19 г/см³, отмеренную мерным цилиндром вместимостью 100 см³. Перемешивают до полного растворения и доводят до метки дистиллированной водой. После приготовления раствора его переносят в стеклянную колбу с плотно притертой пробкой и хранят при температуре от плюс 20° С до плюс 25° С не более 3 мес.

9.3.3 Приготовление буфера для экстракции аллергена

Буфер для экстракции аллергена (100 см³) поставляется в виде 10-кратного концентрата. Перед разбавлением концентрат буфера нагревают на водяной бане при 37 °С и перемешивают до полного растворения кристаллов, которые могли образоваться в процессе хранения. Нагретый концентрат разводят в 10 раз (соотношение по объему 1 : 10) дистиллированной водой (например, к 100 см³ концентрата добавляют 900 см³ дистиллированной воды). Приготовленный буфер для экстракции аллергена можно использовать в течение не более 12 нед при температуре хранения от 2 °С до 8 °С.

9.3.4 Приготовление буфера для экстракции аллергена, содержащего добавку 1 (буфер А-АЕР)

Для приготовления буфера для экстракции аллергена, содержащего добавку 1 (буфер А-АЕР), взвешивают 1,35 г добавки 1 в стеклянном стакане и добавляют 15 см³ раствора NaOH с молярной концентрацией 1 моль/дм³ отмеренные мерным цилиндром. Перемешивают до растворения добавки 1. В 700 см³ приготовленного по п. 9.3.3 буфера для экстракции аллергена, отмеренного мерным цилиндром, добавляют 15 см³ раствора добавки 1, перемешивают вручную несколькими круговыми движениями. Этим же буфером ополаскивают стакан с остатком раствора добавки 1 и вливают обратно в мерный цилиндр. Регулируют pH буфера А-АЕР до pH 9,0 с помощью раствора HCl с молярной концентрацией 1 моль/дм³ и доводят объем до 750 см³ приготовленным по п. 9.3.4 буфером для экстракции аллергенов. 750 см³ буфера А-АЕР достаточно для проведения 45 измерений. Буфер может храниться в прозрачной стеклянной колбе при температуре от 20 °С до 25 °С в течение не более 3 нед или при температуре от 2 °С до 8 °С в течение не более 8 нед. Не допускается использование буфера А-АЕР, если в процессе хранения в нем выпали кристаллы или раствор помутнел.

9.3.5 Приготовление раствора экстрактора 2



Экстрактор 2 (три флакона по 30 см³ каждый) поставляется в виде двукратного концентрата и должен быть разбавлен в два раза (соотношение по объему 1 : 1) дистиллированной водой (например, 50 см³ экстрактора 2 и 50 см³ дистиллированной воды). Приготовленного раствора экстрактора 2 достаточно для проведения 45 измерений. Раствор экстрактора 2 может храниться в течение не более 3 мес при температуре от 20 °С до 25 °С.

9.3.6 Приготовление раствора конъюгата антител с пероксидазой

Конъюгат антител поставляется в концентрированном виде (11-кратный концентрат). Перед приготовлением раствора конъюгата осторожно встряхивают флакон с концентратом. Для приготовления рабочего раствора конъюгата в стеклянную пробирку вместимостью 5 или 10 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата конъюгата объемом не менее 200 мм³, добавляют дозатором в 10 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата конъюгата объем буфера для разбавления концентрата конъюгата (например, смешивают 200 мм³ концентрата конъюгата с 2 см³ буфера для разбавления концентрата конъюгата, что достаточно для двух микротитровальных стрипов). Содержимое пробирки перемешивают на вортексе (п. 4.1.8).

Поскольку приготовленный раствор конъюгата имеет ограниченную стабильность, следует готовить необходимое количество раствора непосредственно перед началом анализа.

9.3.7 Приготовление раствора промывочного буфера

Промывочный буфер поставляется в концентрированном виде (10-кратный концентрат). Перед разбавлением промывочного буфера растворяют кристаллы, которые могли образовываться во флаконе с концентратом при его хранении. Для этого помещают флакон на водяную баню при температуре 37 °С и периодически перемешивают до растворения кристаллов.

Для приготовления раствора промывочного буфера отмеренную цилиндром аликвоту концентрата промывочного буфера объемом 50 или 100 см³ вносят в коническую колбу вместимостью 500 или 1000 см³ и добавляют отмеренную цилиндром вместимостью 1000 см³ дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в девять раз больше, чем объем концентрата промывочного буфера (например, 100 см³ концентрированного промывочного буфера и 900 см³ дистиллированной воды). Полученный раствор промывочного буфера может храниться при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 1 мес.

9.4 Подготовка проб

При пробоподготовке важно соблюдать условия, изложенные в п. 9.2. Образцы сложносоставных мучных и кондитерских изделий измельчают с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или блендера лабораторного. Образцы сухих смесей для детского питания, консервированных жидких и пастообразных продуктов тщательно перемешивают.

При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью 0,01 г либо две параллельные дозы по 1,0 см³, отобранные с точностью 0,1 см³ (для жидких образцов). Навески либо аликвоты помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³. В каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 4,0 см³ приготовленного по 9.3.5 экстрактора 2.

Пробирки закрывают завинчивающимися крышками, интенсивно встряхивают вручную, переворачивая, для равномерного распределения пробы и экстрактора 2.



Пробирки выдерживают в течение 10 мин на кипящей водяной бане при нормальном атмосферном давлении (от 84,0 до 106,7 кПа).

В охлажденные до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С пробирки вносят 16 см³ (для образцов в твердом агрегатном состоянии, взвешенных на весах) или 15 см³ (для жидких образцов, отобранных дозатором) предварительно нагретого до 60 °С буфера для экстракции аллергена содержащего добавку 1 (буфер А-АЕР) и тщательно перемешивают на лабораторном вортексе в течение 30 с при частоте вращения 1800 об/мин.

Инкубируют пробирки в течение 10 мин на водяной бане при температуре плюс 60 °С.

Охлаждают пробирки до температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С и центрифугируют при относительным центробежным ускорением не менее 2500 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость фильтруют с помощью бумажного складчатого фильтра.

Надосадочную жидкость хранят в плотно закрытых пробирках с завинчивающейся крышкой в течение 3 сут при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильнике или в течение 3 мес при температуре минус 20 °С.

Аликвоту надосадочной жидкости в количестве 100 мм³ переносят в стеклянную пробирку и добавляют 400 мм³ приготовленного согласно п. 9.3.3 раствора буфера для экстракции аллергена без добавки 1. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе.

Для проведения ИФА используют 100 мм³ полученного раствора проб на микролунку титровального планшета.

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 окружающей среды (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 окружающей среды. 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 интенсивности, с которой промываются микролунок. Необходимо тщательно следовать процедуре промывки, как описано в п. 10.2.3.

На время инкубации рекомендуется покрыть 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 следует перемешать путем осторожного вращения флаконов в течение 10-15 с. Для этих целей можно использовать вортекс, настроенный на минимальные обороты. Растворы из концентрированных реагентов, кроме промывочного буфера готовят непосредственно перед проведением ИФА.

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

$$N_w = 10 + 2 \cdot N_{smp},$$

где N_{smp} – количество анализируемых образцов;



10 – 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 $N_{\text{л}}$. 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 в п.4.1.2, 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 трех стрипов. Если необходимо провести измерение более семи образцов, ИФА выполняется несколько раз. Также при необходимости использования больше, чем трех стрипов, в качестве предварительных этапа можно использовать инертный микротитровальный планшет без покрытия лунок антителами по п.4.2.17, чтобы избежать «сдвига во времени» при пипетировании одноканальным дозатором в лунки микротитровального планшета. Все градуировочные растворы и растворы образцов пипетируют в пустые лунки инертного планшета (по 150 мм^3 на лунку), а затем переносят на микротитровальный планшет с антителами при помощи 8-канального дозатора пипеточный переменного объема, настроенного на объем дозирования 100 мм^3 .

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 иммуноферментного анализа 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 белка коровьего молока в пищевой продукции выполняют следующие операции: внесение градуировочных растворов и растворов проб, инкубация микротитровального планшета, промывка микротитровального планшета, добавление раствора конъюгата, 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 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.5.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 100 мм^3 каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания значений массовой доли градуировочных растворов (0; 2,5; 7,5; 22,5;



67,5 мг/кг). В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 100 мм^3 двух параллельных проб каждого образца.

10.2.2 Инкубация микротитровального планшета

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 10 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 10 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.

10.2.3 Промывка микротитровального планшета

Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 раствора промывочного буфера, приготовленного по п. 9.3.6, 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 трёх до четырёх, объем заливаемого моющего раствора – 250 мм^3 .

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

10.2.4 Добавление раствора конъюгата

Во все лунки микротитровального планшета добавляют по 100 мм^3 раствора конъюгата, приготовленного по п. 9.3.5. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 с.

10.2.5 Повторная инкубация микротитровального планшета

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 10 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 10 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 микротитровального планшета

Повторяют процедуру, описанную в п. 10.2.3.

10.2.7 Внесение субстрата / хромогена

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора во все лунки микротитровального планшета добавляют по 100 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 10 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 10 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.

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 мм³ стоп реагента и аккуратными 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 белка коровьего молока

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

- Построение градуировочной зависимости массовой доли белка коровьего молока – относительная оптическая плотность.

- Расчет фактического значения массовой доли белка коровьего молока в пробах на основании рассчитанного значения относительной оптической плотности.

Для получения результата измерения массовой доли белка коровьего молока в пробах задают следующие настройки:

- Последовательно открывают следующие окна ПО: Food and Feed→Allergen→Fast Milk.met→Edit→Method.

- Количество параллельных определений образца (Samples→Replicates) – 1.

- Количество параллельных определений стандарта (Standarts→Replicates) – 2.

При оценке значений измеренной оптической плотности руководствуются следующими правилами:

- Оптическая плотность в лунке с нулевым стандартом не должна быть больше 0,15, в противном случае это свидетельствует о недостаточной отмывке планшета или о контаминации нулевого раствора молочным белком.

- В случае, если величина оптической плотности, измеренной в лунке с пятым стандартом, не превышает 0,8, это является признаком порчи реагентов.

В данных случаях анализ необходимо повторить с другим тест-набором реагентов.

В случае, если результаты измерения массовой доли белка коровьего молока находятся вне диапазона градуировки, следует поступать согласно п. 12.2 или 12.3. Экстраполяция результатов вне диапазона градуировочного графика не допускается.

За окончательный результат измерений массовой доли белка коровьего молока принимают среднее арифметическое результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.2

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



где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой доли белка коровьего молока в параллельных пробах, полученные при помощи ПО, мг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

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

Примечание – Результаты представлены в миллиграммах белка коровьего молока на килограмм образца.

Для оценки содержания молока в исследуемом образце используют следующий коэффициент пересчета. Молоко содержит примерно 3,2 % белка коровьего молока. Таким образом, значение в образце массовой доли белка коровьего молока 1 мг/кг соответствует значению массовой доли молока примерно 31 мг/кг. Полученное значение массовой доли молока является приблизительной оценкой.

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 массовой доли белка коровьего молока в параллельных пробах 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 значение \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 массовой доли белка коровьего молока в параллельных пробах одного образца, мг/кг;

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

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

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений массовой доли белка коровьего молока, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

Массовая доля белка коровьего молока составляет $(\bar{X} \pm U(\bar{X}))$, мг/кг, при $P=0,95, K=2$ (5)

где \bar{X} – результат измерений массовой доли белка коровьего молока, 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

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

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 белка коровьего молока 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 белка коровьего молока в образце с использованием предела измерений

менее X_{DL} ,

где X_{DL} – значение нижней границы диапазона измерений, равное 2,5 мг/кг.

12.3 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли белка коровьего молока с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается большим, чем значение верхней границы диапазона измерений, равное 67,5 мг/кг, то дается односторонняя оценка массовой доли белка коровьего молока в образце с использованием предела измерений

более X_{HL} .

где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений, равное 67,5 мг/кг.

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

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 белка коровьего молока 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 промежуточной прецизионности, 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 массовой доли белка коровьего молока, \bar{X} , мг/кг, результатов измерений соответственно

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

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 арифметическое, 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

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

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

$r_{I(TO)}$ – относительное значение предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «оператор-время», %, при $P = 95$ %, приведенное в таблице 4.

Таблица 4 – Относительные значения предела повторяемости, промежуточной прецизионности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Предел промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «оператор-время» $r_{I(TO)}$, %	Норматив контроля правильности $K_{отп}$, %
Пищевая продукция, предназначенная для детского питания: пищевая продукция, относящаяся к пищевой продукции специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная производителями, как не содержащая коровье молоко или с низким содержанием коровьего молока Сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания. Сложносоставные мучные и кондитерские изделия	11,0	15,0	13,0

10. При невыполнении условия (8) проводят повторные измерения согласно разделу



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 белка коровьего молока производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением массовой доли аналита (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок белка коровьего молока. Неопределенность аттестованного значения массовой доли белка коровьего молока 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 белка коровьего молока в которой менее предела измерения данной методикой, в которую внесена добавка раствора белка коровьего молока. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой доли белка коровьего молока 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 белка, мкг/см³;
 V_{ST} – объем раствора белка, см³;
 m – масса навески пробы, г.

Величина массовой доли белка коровьего молока в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Для внесения добавки используют раствор, приготовленный из образца с аттестованным значением массовой доли белка коровьего молока 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 белка коровьего молока 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 белка коровьего молока 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 r , приведенного в таблице 4, значение $1,43 \cdot r$.

Критерием приемлемости является условие



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

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

X_{mlk} – расчетное значение массовой доли белка коровьего молока 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 МВИ, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для их построения используют установленные показатели повторяемости при проведении валидации МВИ.

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 раствора аналита. Предварительно установленная массовая доля аналита в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения, декларируемого изготовителем тест-системы. Рекомендуется вносить добавку аналита в образцы для контроля на уровне массовой доли 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 σ_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

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r.$$

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 методикой, 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 – значение результатов измерений массовой доли белка коровьего молока в образцах в условиях повторяемости, мг/кг.

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 – массовая доля белка коровьего молока в пробе с добавкой, полученное для i -го измерения, мг/кг;

X_{exp} – рассчитанное значение массовой доли белка коровьего молока в пробе с добавкой, мг/кг.

- Предупреждающие границы

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

- Границы регулирования

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

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 методикой, 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

