

ДЗЯРЖАУНЫ КАМІТЭТ ПА СТАНДАРТЫЗАЦЫЎ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ОКПО 02568454
УНН 100055197

Рэспубліканскае унітарнае 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 BPSBYY2X г. Мінск праспект Машэрава, 80
УНП 100055197, АКПА 02568454

Рэспубліканскае унітарнае прадпрыемства
“БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ИНСТИТУТ МЕТРОЛОГИИ”
- БелГИМ -

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

IBAN BY11 BPSB 3012 1027 7601 4933 0000
Региональная дирекция №700 по г. Минску
и Минской области ОАО «БПС-Сбербанк»,
BIC SWIFT BPSBYY2X, г. Минск проспект Машерова, 80
УНП 100055197, ОКПО 02568454

05.12. 2019 г. № 28-12/30576

На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 1195/2019 об аттестации МВИ

Метод измерений массовой доли яиц в 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 6205-2019 «Методика выполнения измерений «Определение яиц в 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 $P=0,95$:

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группа продуктов	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{\text{пчт}}$, %	Относительная суммарная стандартная неопределенность $\frac{u_c(X)}{X}$, %	Относительная расширенная неопределенность U , % (k=2, P=95%)
Массовая доля яиц	от 0,50 до 13,50 вкл.	Пищевая продукция специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная изготовителем, как не содержащая яиц (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия для детского питания)	4,7	8,1	11	22

Первый заместитель директора



Н.В. Баковец

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
РУП «Научно-практический центр
Национальной академии наук
Беларуси по продовольствию»



[Handwritten signature]

З.В. Ловкис

2019 г.

Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь

Методика выполнения измерений

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЯИЦ В НИЗКОАЛЛЕРГЕННЫХ ПРОДУКТАХ
ДЛЯ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ МЕТОДОМ ИФА

МВИ. МН 6205-2019

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)
Свидетельство № 1195 / 2019
об аттестации МВИ от 05.12. 20 19 г.

РАЗРАБОТЧИК

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



[Handwritten signature]
И.М. Почицкая

2019 г.

Минск, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

	Вводная часть	4
1	Нормативные ссылки	4
2	Показатели точности измерений	5
3	Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы	6
4	Метод измерений	8
5	Требования к безопасности, охране окружающей среды и к квалификации операторов	9
5.1	Требования к безопасности, охране окружающей среды	9
5.2	Требования к квалификации операторов	9
6	Условия измерений	9
7	Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении	9
8	Условия хранения тест-системы	10
9	Подготовка к выполнению измерений	10
9.1	Отбор образцов	10
9.2	Подготовка помещения и лабораторной посуды	10
9.3	Приготовление растворов	11
9.3.1	Приготовление буфера для экстракции аллергена	11
9.3.2	Приготовление раствора конъюгата антител с пероксидазой	11
9.3.3	Приготовление раствора промывочного буфера	11
9.3.4	Предварительный нагрев буфера для экстракции аллергена	12
9.4	Подготовка проб	12
9.4.1	Пробоподготовка твердых образцов	12
9.4.2	Пробоподготовка жидких образцов	12
9.5	Подготовка тест-системы	13
9.5.1	Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении	13
9.5.2	Подготовка микротитровального планшета	13
10	Проведение измерений	14
10.1	Общие сведения	14
10.2	Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа	14
10.2.1	Внесение градуировочных растворов и растворов проб	14
10.2.2	Инкубация микротитровального планшета	14
10.2.3	Промывка микротитровального планшета	15
10.2.4	Добавление раствора конъюгата	15
10.2.5	Повторная инкубация	15
10.2.6	Повторная промывка планшета	15
10.2.7	Внесение субстрата/ хромогена	15
10.2.8	Заключительный этап инкубации	15
10.2.9	Завершение реакции окрашивания	15
10.2.10	Измерение оптической плотности	15
11	Обработка результатов измерений	16
11.1	Расчет массовой доли яиц	16
11.2	Проверка приемлимости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	17
12	Оформление результатов измерений	17
12.1	Форма представления результатов измерений с использованием	17



	расширенной неопределенности	
12.2	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли яиц с использованием предела измерений	18
12.3	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли яиц с использованием значения верхней границы диапазона измерений	18
13	Контроль точности результатов измерений	18
13.1	Оперативный контроль результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	18
13.2	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	18
13.3	Контроль правильности результатов измерений	19
13.3.1	Образцы для контроля правильности	20
13.3.2	Проведение контрольной процедуры	20
13.4	Контроль стабильности результатов измерений	20
13.4.1	Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта	20
13.4.2	Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация контрольных карт размахов для контроля стабильности СКО повторяемости	21
13.4.3	Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности	21
	Библиография	23



Вводная часть

Настоящая методика выполнения измерений (далее – МВИ) устанавливает методику выполнения измерений массовой доли яиц в низкоаллергенных продуктах для детского питания методом иммуноферментного анализа (далее – ИФА) с использованием тест-системы RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein.

МВИ распространяется на следующую пищевую продукцию, предназначенную для детского питания: пищевую продукцию, относящуюся к пищевой продукции специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированную изготовителями, как несодержащую яиц (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия для детского питания) и устанавливает ИФА для определения содержания яиц.

Методика предназначена для проведения измерений массовой доли яиц с использованием тест-системы RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein (далее – тест-система). Тест-система RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein использует градуировочные растворы, приготовленные на основе эталонного образца яичного порошка NIST Referens Material 8445 (whole egg powder). Измерение массовой доли яиц основано на определении протеинов яичного белка (см. раздел 4), поэтому массовая доля яиц в соответствии с настоящей МВИ выражается в пересчете на яичный порошок, с массовой долей белка (48 ± 1) %, состав протеинов которого соответствует данному эталонному образцу.

Диапазон измерений МВИ составляет от 0,50 до 13,50 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

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 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. Методики выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Безопасность. Общие требования



ГОСТ 12.2.003-91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 1770-74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ OIML R 76-1-2011	Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования испытаний
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

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

Настоящая МВИ обеспечивает измерение массовой доли яиц в диапазоне с показателями точности, относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности, указанными в таблице 1.

Таблица 1 – Метрологические характеристики МВИ

Измеряемая величина	Диапазон измерений, мг/кг	Группы продуктов	Относительное стандартное отклонение повторяемости $\sigma_r, \%$	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_I(т0)\%$	Относительная суммарная стандартная неопределенность $\frac{u_c(X)}{X}, \%$	Относительная расширенная неопределенность U, %, K=2, P=95 %
Массовая доля яиц	от 0,50 до 13,50 включ.	Пищевая продукция специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная изготовителем, как не содержащая яиц (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия для детского питания)	4,7	8,1	11	22

При оценивании показателя правильности была установлена статистическая значимость смещения, которая была учтена при оценивании неопределенности.

Указанные в таблице 1 метрологические характеристики 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 01.03.2019г. по 29.03.2019г. в соответствии с:

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

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

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.

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

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (предел допускаемой погрешности измерения оптической плотности $\pm 5\%$).

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

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

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

Центрифуга лабораторная рефрижераторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 2500 g, а также охлаждение до плюс 4 °С.

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

Лабораторный орбитальный шейкер, обеспечивающий частоту вращения до 300 об/мин.

Гомогенизатор, лабораторный блендер или мельница.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от плюс 37 °С до плюс 60 °С с точностью ± 2 °С.

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

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 $\pm (2,0 - 1,5)\%$.

Оборудование, использование которого 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 до 350 мм³.

Пробирки пластиковые для центрифугирования с крышкой вместимостью 15 и 50 см³.

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

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

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

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

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

Цилиндр мерный вместимостью 1000 см³, 2-1000-1 по ГОСТ 1770.

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

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

Пипетки 1-2-20, 1-2-25 по ГОСТ 29169.

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

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода деионизированная.

Микротитровальный инертный планшет без покрытия антителиами с низким связыванием, например производства Greiner Bio-One, Frickenhausen, Германия, кат. 655101.

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

Казеин из коровьего молока (пр-ва Sigma арт. C5890) для подготовки проб, содержащих пажитник, гвоздику, сельдерей, горчицу.

Образец яичного порошка с аттестованным значением массовой доли белка NIST Reference Material 8445 (whole egg powder) с массовой долей белка (48 ±1) %.

Бумага фильтровальная ФБ-III по ГОСТ 12026.

Пленка «парафильм» или скотч.

Шпатели пластиковые.

Штативы для пробирок и одноразовых наконечников.

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Тест-система RIDASCREEN®FAST Ei / Egg Protein, арт. № R6402 производства фирмы R-Biopharm (Германия) – набор реактивов, градуировочных растворов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению содержания яиц в продуктах питания методом ИФА. Состав тест-системы приведен в таблице 2.



Таблица 2 – Состав тест-системы RIDASCREEN®FAST Ei/ Egg Protein для определения массовой доли яиц

Компонент системы	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет с 48 лунками, сенсibilизированный антителами к белку яиц (6 стрипов по 8 лунок)	1 шт
Градуировочные растворы яичного порошка с массовой долей: 0 мкг/кг (нулевой градуировочный раствор), 0,5; 1,5; 4,5; 13,5 мг/кг, готовые к применению ¹⁾ , 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
Субстрат/ Хромоген (содержит пероксид мочевины и тетраметилбензидин) (коричневая крышка)	1 шт × 10,0 см ³
Стоп-реагент (содержит 1н 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×концентраи моющего буфера (коричневая крышка)	1 шт × 100,0 см ³

¹⁾ Градуировочным растворам присписываются условные значения массовой доли яиц, соответствующие массовой доле яиц в исходной измеряемой пробе образца. Действительные значения величин концентраций градуировочных растворов, входящих в комплект поставки, учитывают фактический коэффициент разбавления пробы, равный 20, который получают в результате процедуры пробоподготовки. Этот факт позволяет находить значение массовой доли яиц в анализируемом образце по результату измерения массовой доли яиц в подготовленном растворе пробы, полученному сразу по градуировочной кривой.

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

4 Метод измерений

Измерение массовой доли яиц выполняют методом ИФА.

Основой метода является реакция антиген-антитело. Для детекции используют антитела специфичные к протеинам яичного белка. Дно ячеек микротитровального планшета покрыто данными антителами в качестве захватывающих антител. Градуировочные растворы яичного порошка и экстракты образцов инкубируют в течение 10 мин при температуре окружающей среды. В ходе реакции антигены (яичный белок) растворов проб или градуировочных растворов взаимодействует с антителами адсорбированными на поверхности лунок микротитровального планшета, что приводит к образованию комплекса антиген-антитело. Несвязанные антигены удаляются на стадии промывки, затем вносится ферментно маркированные антитела (конъюгат) к комплексу яичный белок (антиген)-антитело к яичному белку и инкубируют в течение еще 10 мин. Эти конъюгаты связываются с комплексом яичный белок-антитело на пластинке с образованием комплексов антитело-антиген-антитело(сэндвич иммуно-ферментный анализ). Несвязавшийся конъюгат фермента затем удаляют с помощью промывки. Субстрат / хромоген добавляют в лунки и инкубируют в течение 10 мин. Связанный фермент окрашивает субстрат / хромоген в голубой цвет. Добавление останавливающего реагента ингибирует ферментативный процесс и вызывает изменение цвета на желтый. Измерение оптической плотности выполняется с помощью микропланшетного фотометра в течение 10 мин после внесения стоп-реагента при 450 нм. Полученные значения оптической плотности прямо пропорциональны массовой доле яиц в исследуемых образцах.

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



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

5.1 Требования к безопасности, охране окружающей среды

При выполнении работ по определению массовой яиц соблюдают требования:

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

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 3 содержит β -меркаптоэтанол (неприятно пахнущее вещество).

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

5.2 Требования к квалификации операторов

К проведению работ и обработке результатов измерений 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.

6 Условия измерений

При отборе проб и 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-системы

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 среды (от плюс 20 °С до плюс 25 °С) тест-системы, если ИФА выполняется несколько раз. Для этого целесообразно одновременно проводить анализ не менее 10-11 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 наборов других партий не допускается.

Многократное 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 ($A_{450\text{nm}} < 0,8$) для градуировочного раствора 5 с массовой долей 13,5 мг/кг.

9 Подготовка к выполнению измерений

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

9.1 Отбор образцов

Отбор и подготовку образцов к испытанию проводят согласно СТБ 1036. Образцы в не вскрытой продовольственной таре или образцы, отобранные в герметичную упаковку, хранятся в соответствии с условиями хранения, указанными на этикетке либо согласно условиям хранения данного вида продукции. Вскрытые образцы, образцы с нарушением целостности упаковки дальнейшему хранению не подлежат из-за возможной порчи или загрязнения.

9.2 Подготовка помещения и лабораторной посуды

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

- осуществлять пробоподготовку и постановку ИФА в разных комнатах;
- выполнять анализ в одноразовых резиновых перчатках;
- 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.



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 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. Разбавляют нагретый концентрат дистиллированной водой в соотношении 1:9 (одна часть концентрата и девять частей дистиллированной воды) (например, 100 см³ концентрата + 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.

9.3.2 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 дистиллированной воды (например, смешивают 200 мм³ концентрата конъюгата и 2 см³ дистиллированной воды, что достаточно для двух микротитровальных стрипов). Содержимое пробирки перемешивают на вортексе.

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

9.3.3 Приготовление раствора промывочного буфера

Промывочный буфер поставляется в концентрированном виде (10-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 50 или 100 см³ приливают в 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 концентрата промывочного буфера плюс 900 см³ дистиллированной воды). Полученный раствор промывочного буфера может храниться при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение 1 мес.



9.3.4 Предварительный нагрев буфера для экстракции аллергена

В нагретую до 60 °С водяную баню помещают приготовленный по 9.3.1 буфер для предварительного нагрева.

9.4 Подготовка проб

При проведении пробоподготовки важно соблюдать условия, изложенные в п. 9.2.

Пробоподготовка различных образцов несколько отличается в зависимости от их агрегатного состояния и вида исследуемой матрицы:

- твердые образцы, а так же образцы с неоднородным распределением яиц тщательно гомогенизируют с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или блендера лабораторного до порошкообразного состояния.
- жидкие образцы тщательно перемешивают.
- для порошкообразных образцов дополнительная обработка не требуется.

9.4.1 Пробоподготовка твердых образцов

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³. В каждую пробирку добавляют дозатором 20,0 см³ приготовленного по 9.3.1 и предварительно нагретого по 9.3.4 буфера для экстракции аллергена.

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

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

Охлажденные до температуры окружающей среды пробирки центрифугируют при не менее 2500 g в течение 10 мин при температуре 4 °С. Фильтруют супернатант с помощью фильтровальной бумаги.

Надосадочную жидкость можно хранить в плотно закрытых пробирках с завинчивающейся крышкой в течение 1 сут при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильнике.

Полученный раствор проб в количестве 100 мм³ на лунку используется для проведения ИФА.

9.4.2 Пробоподготовка жидких образцов

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные пробы по 1,0 см³, отобранные с точностью 0,01 см³. Аликвоты помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³. В каждую пробирку добавляют дозатором 19,0 см³ приготовленного по 9.3.1 и предварительно нагретого по 9.3.4 буфера для экстракции аллергена.

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

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

Охлажденные до температуры окружающей среды пробирки центрифугируют при не менее 2500 g в течение 10 мин при температуре 4 °С. Фильтруют супернатант с помощью фильтровальной бумаги.

Надосадочную жидкость можно хранить в плотно закрытых пробирках с завинчивающейся крышкой в течение 1 сут при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в холодильнике.



Полученный раствор проб в количестве 100 мм^3 на лунку используется для проведения ИФА.

Примечание – Если образцы содержат пажитник, гвоздику, горчицу или сельдерей, то в такие образцы для предотвращения нарушающего анализ эффекта добавляется казеин в пропорции 1 г казеина в 1 г или 1 см^3 образца. При анализе образцов с неизвестным составом казеин может быть добавлен в качестве меры предосторожности.

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 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ до плюс $25 \text{ }^\circ\text{C}$) в течение не менее 1 ч, не открывая упаковку микротитровального планшета. Доводят температуру остальных реагентов до температуры от плюс $20 \text{ }^\circ\text{C}$ до плюс $25 \text{ }^\circ\text{C}$. После окончания анализа реагенты тест-системы немедленно помещают в холодильник.

Не допускается высушивание микролунок между стадиями ИФА.

Воспроизводимость в любом ИФА во многом зависит от интенсивности, с которой промываются микролунок. Необходимо тщательно следовать повторности промывки планшета, как описано в п 10.2.3.

На время инкубации рекомендуется покрывать микротитровальных планшетов 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 (допустимо использовать вортекс, настроенный на минимальные обороты). Растворы из концентрированных реагентов, кроме промывочного буфера готовятся непосредственно перед проведением ИФА.

Не допускается переливать обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемых при проведении измерений согласно п. 10.

9.5.2 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 10 + 2 \cdot N_{smp} \quad (1)$$

где N_{smp} – количество анализируемых образцов;

10 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленными 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 ПО, 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 планшет без покрытия лунок антителями (например инертный, с низким связыванием Greiner Bio-One, Frickenhausen, Германия, кат. 655101), чтобы избежать сдвига во времени по планшету при микротитровании (раскапывании). Все калибровочные растворы и растворы образцов пипетируют в пустые лунки инертного планшета (по 150 мм³ на лунку), а затем быстро переносят на микротитровальный планшет с антителями при помощи 8-канального пипет-дозатора, настроенного на объем дозирования 100 мм³.

10 Порядок выполнения измерений

10.1 Общие сведения

При выполнении измерений массовой доли яиц 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.

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 отмытки 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 необходимо руководствоваться инструкциями и правилами работы с данными устройствами. В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета. На всех стадиях инкубации избегают воздействия прямого солнечного света.

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 дозатором две аликвоты объемом 100 мм³ каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания массовой доли градуировочных растворов (т.е. 0; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5 мг/кг). В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 100 мм³ двух параллельных проб каждого образца.

10.2.2 Инкубация микротитровального планшета

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С 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 мм³ раствора промывочного буфера, приготовленного по п. 9.3.3, 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 мм³.

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 мм³ раствора конъюгата, приготовленного по п. 9.3.2. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 с.

10.2.5 Повторная инкубация

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С 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 мм³ раствора субстрата / хромогена. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 с.

10.2.8 Заключительный этап инкубации

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С 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).

10.2.9 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.

Бумажной салфеткой вытирают нижнюю наружную поверхность лунок планшета.

10.2.10 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. Если используемая модель фотометра совместима с ПО, то управление прибором осуществляется через интерфейс программы.

При работе в соответствии с описанной процедурой пробоподготовки согласно п. 9.4 фактор разведения составляет 20. Экстраполяция результатов вне диапазона градуировки не допускается.

11 Обработка результатов измерений

11.1 Расчет массовой доли яиц

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 яиц – относительная оптическая плотность.
- Расчет фактического значения массовой доли яиц в пробах на основании рассчитанного значения относительной оптической плотности.

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

- Последовательно открывают следующие окна ПО: Food and Feed→Allergen→Fast Egg.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 градуировочным раствором не должна быть больше 0,15, в противном случае это свидетельствует о недостаточной отмывке планшета или о контаминации нулевого раствора.
- В случае если величина оптической плотности, измеренной в лунке с 5-м градуировочным раствором, не превышает 0,8, это является признаком порчи реагентов.

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

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 яиц в параллельных пробах, мг/кг, полученные при помощи программного обеспечения.

Окончательный результат измерений округляют до второго десятичного знака.

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

Примечание – Тест система откалибрована по яичному порошку NIST Referens Material 8445 (whole egg powder) с содержанием общего яичного белка (48 ± 1) %. Таким образом, результаты представлены в миллиграммах яичного порошка на килограмм образца. Если необходимо определение содержания общего яичного белка в исследуемом образце, то используют коэффициент пересчета 0,49. Яичный порошок содержит примерно 49% общего яичного белка. Если в образце найдено значение массовой доли яиц 10 мг/кг, то это соответствует массовой доле общего яичного белка примерно 4,9 мг/кг. Полученное значение массовой доли общего яичного белка является приблизительным значением.



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 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 параллельных измерений проб одного образца, мг/кг;

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

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 яиц в мг/кг, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$\text{Массовая доля яиц составляет } (\bar{X} \pm U(\bar{X})), \text{ при } P=0,95, K=2 \quad (5)$$

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

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

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

Расширенную неопределенность результата измерений $U(X)$, 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 1, %.

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

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



12.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли яиц с использованием предела измерений

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается меньшим, чем значение нижней границы диапазона измерений, равное 0,50 мг/кг, то дается односторонняя оценка массовой доли яиц в образце с использованием предела измерений

менее X_{DL} , мг/кг,

где X_{DL} – значение нижней границы диапазона измерений.

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

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается большим, чем значение верхней границы диапазона измерений, равный 13,50 мг/кг, то дается односторонняя оценка массовой доли яиц в образце с использованием предела измерений

более X_{HL} ,

где X_{HL} – значение верхней границы диапазона измерений.

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 яиц 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.

Среднее арифметическое \bar{X} , мг/кг, результатов измерений -рассчитывают по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}. \quad (7)$$

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений $|X_1 - X_2|$, полученными в условиях промежуточной прецизионности, значение, которого сравнивают с абсолютным значением критической разности (норматив контроля промежуточной прецизионности) CD_{abs} . Если выполняется условие



$$|X_1 - X_2| \leq CD_{abs}, \quad (8)$$

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 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 3;

$r_{I(TO)}$ – 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» $r_{I(TO)}$, %	Норматив контроля правильности K_{omis} , %
Пищевая продукция специализированного низкоаллергенного (гипоаллергенного) питания, замаркированная изготовителями, как не содержащая яиц (сухие смеси для детского питания, консервированные жидкие и пастообразные продукты для детского питания, сложносоставные мучные и кондитерские изделия для детского питания)	13,2	22,7	21,0

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

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 определения массовой доли яиц производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением массовой доли яиц (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок яиц. Неопределенность аттестованного значения массовой доли яиц 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 яиц в которых менее предела измерения данной методикой, в которую внесена добавка раствора яичного порошка. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой доли яиц в пробе с добавкой X_{am} , мкг/кг, рассчитывается по формуле

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

где C_{ST} – концентрация раствора яичного порошка, мг/см³;

V_{ST} – объем раствора яичного порошка, см³;

m – масса навески пробы, г.

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

Для внесения добавки используют раствор, приготовленный из яичного порошка в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией (раздел 3) и согласно рекомендациям изготовителя тест-системы [5].

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 яиц 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 образца 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 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, % (таблица 3);

X_{Gl} – расчетное значение массовой доли яиц 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.

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 аналита в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения, декларируемого изготовителем тест-системы. Рекомендуется вносить добавку исследуемого вещества в образцы для контроля на уровне значений массовой доли 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

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

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 методикой, расчет фактических относительных значений размаха W по формуле (19), 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 яиц 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 контрольного вещества, по формуле

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



где X_i – массовая доля исследуемого вещества в пробе с добавкой, полученное для i -го измерения, мг/кг;

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

Предупреждающие границы

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

• Границы регулирования

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

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

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

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 (18), оформлении листа данных контрольных карт и нанесения данных на эти карты.



Библиография

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

- [1] Отчет об экспериментальных исследованиях метрологических характеристик методики выполнения измерений «Определение яиц в низкоаллергенных продуктах для детского питания методом ИФА», Минск 2019
- [2] ISO 21748:2017 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и точности при оценивании неопределенности измерения
- [3] Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК
Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях – 3-е издание, перевод с английского выполнен Уральским научно-исследовательским институтом метрологии, 2018
- [4] ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008 Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения.
- [5] R-Biopharm Allergen Test Kits. Spike Instructions for R-Biopharm Allergen Test Kits. Spiked Samples for Allergen Determination [Электронный ресурс]. – Код доступа: [http:// www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com) (дата обращения 05.06.2017).

