

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по качеству
ООО «Альгимед Техно»

 С.М. Слиж

« 17 » _____ 2023

Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь
МАССОВАЯ ДОЛЯ ЗЕАРАЛЕНОНА В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ,
КОРМАХ, КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ
И СЫРЬЕ ДЛЯ ИХ ПРОИЗВОДСТВА
Методика измерений методом ИФА с использованием
наборов реагентов «ИФА микотоксин- зеараленон»

Разработчик:

Начальник отдела испытаний
пищевой и с/х продукции БелГИМ

 Н.В. Вошула

« 02 » _____ 2023

2023

Содержание

Вводная часть.....	3
1 Рабочие характеристики, включая показатели точности измерений, методики	3
2 Нормативные ссылки.....	6
3 Средства измерений, программное обеспечение, вспомогательные устройства, материалы, реактивы.....	7
3.1 Средства измерений.....	7
3.2 Вспомогательные устройства, программное обеспечение.....	8
3.3 Материалы, реактивы, посуда.....	9
4 Метод измерений	10
5 Требования безопасности, охраны окружающей среды.....	10
6 Требования к квалификации персонала, выполняющего измерения	11
7 Требования к условиям измерений	11
8 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении.....	11
9 Условия хранения набора реагентов	11
10 Требования к отбору и хранению проб	11
11 Подготовка к выполнению измерений	12
11.1 Перечень работ, проводимых при подготовке к выполнению измерений.....	12
11.2 Выбор способа выполнения измерений.....	12
11.3 Подготовка лабораторной посуды	12
11.4 Приготовление растворов	12
11.5 Подготовка проб	13
11.6 Подготовка набора реагентов	14
11.7 Подготовка оборудования.....	15
12 Порядок выполнения измерений	15
12.1 Общие требования	15
12.2 Требования при выполнении ИФА при использовании более шести стрипов одновременно.....	15
12.3 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа.....	15
13 Порядок обработки результатов измерений.....	17
13.1 Расчет массовой доли в пробах.....	17
13.2 Расчет и интерпретация окончательного результата измерений	18
13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	19
14 Форма представления результатов измерений	20
14.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности	20
14.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли с использованием нижней границы диапазона измерений.....	20
14.3 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли с использованием верхней границы диапазона измерений	20
15 Контроль точности результатов измерений	20
15.1 Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости.....	21
15.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности.....	21
15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости	21
15.4 Контроль правильности	22
15.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК).....	24
Приложение А (справочное) Метрологические характеристики средств измерений ..	27
Библиография	29

Вводная часть

Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее – методика) массовой доли зеараленона методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «ИФА микотоксин–зеараленон» в следующей пищевой продукции, кормах, кормовых добавках и сырье для их производства:

- в зерновых культурах (в т.ч. пшенице, ржи, овсе, просе, гречихе, рисе, кукурузе, тритикале, ячмене, сорго);
- в мукомольно-крупяных изделиях (в т.ч. муке, крупе, отрубях, мучке), макаронных изделиях, ржаных и пшеничных хлебобулочных изделиях, мучных кондитерских изделиях;
- в зернобобовых культурах (в т.ч. горохе, фасоли, сое, нуте, чечевице, маше, чине, вике, люпине);
- в масличных культурах (в т.ч. сое, рапсе, подсолнечнике, льне) и продуктах их переработки (в т.ч. жмыхах, шротах);
- в кормах и комбикормах для животных на основе зерновых, зернобобовых, масличных культур или продуктов их переработки.

Диапазоны измерений массовой доли зеараленона приведены в таблице 1.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями [1], [2], [3] и может применяться при измерениях в сфере законодательной метрологии, а также вне неё, в том числе в следующих областях:

- обеспечение защиты жизни и охраны здоровья человека;
- проведение испытаний и осуществление контроля за соответствием продукции и сырья требованиям законодательства;
- проведение лабораторно-диагностических исследований.

Методика может применяться в испытательных лабораториях любой принадлежности при испытаниях согласно указанной выше области применения с целью определения в них зеараленона при оценке соответствия требованиям технических нормативных правовых актов в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА) и для иных целей.

1 Рабочие характеристики, включая показатели точности измерений, методики

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой доли зеараленона в диапазоне и с показателями точности, указанными в таблице 1.

В результате оценивания показателя правильности была установлена незначимость смещения во всем диапазоне измерений для всех видов продукции согласно области применения методики.

Данные о показателях точности измерений были получены из внутрилабораторного эксперимента, организованного и подвергнутого анализу в соответствии с СТБ ISO 5725-2, [4] в 2023 г в санитарно-гигиенической лаборатории ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск [5]. Экспериментальные данные были получены в условиях повторяемости и промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами: персонал, выполняющий измерения, время. Для проведения экспериментальных исследований по оцениванию показателей точности измерений использовались образцы с добавками зеараленона. Выбросы в полученных данных эксперимента отсутствовали.

Оценивание неопределенности проводилось в соответствии с ГОСТ 34100.1, СТБ ISO 21748, [4] на основании результатов измерений, полученных при проведении эксперимента по оцениванию показателей точности. В таблице 2 приведены значения оценок относительной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности, рассчитанные по данным эксперимента по оцениванию показателей точности.

Таблица 1 – Диапазоны измерений, относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Виды продукции	Измеряемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(To)}$, %
Зерновые культуры (в т.ч. пшеница, рожь, овес, просо, гречиха, рис, кукуруза, тритикале, ячмень, сорго); Мукомольно-крупяные изделия (в т.ч. мука, крупы, отруби, мучки), макаронные изделия, ржаные и пшеничные хлебобулочные изделия, мучные кондитерские изделия; зернобобовые культуры (в т.ч. горох, фасоль, соя, нут, чечевица, маш, чина, вика, люпин); Масличные культуры (в т.ч. соя, рапс, подсолнечник, лен) и продукты их переработки (в т.ч. жмыхи, шроты)	Массовая доля зеараленона	от 25 до 1600	При проведении двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб	
			4,5	5,9
			При проведении одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб	
			4,5	7,0
Корма и комбикорма для животных на основе зерновых, зернобобовых, масличных культур или продуктов их переработки		от 25 до 3200	При проведении двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб	
			4,5	5,9
			При проведении одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб	
			4,5	7,0

Таблица 2 – Неопределенность результатов измерений, получаемых согласно методике

Виды продукции	Измеряемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, ($k = 2, P = 95 \%$)
Зерновые культуры (в т.ч. пшеница, рожь, овес, просо, гречиха, рис, кукуруза, тритикале, ячмень, сорго); Мукомольно-крупяные изделия (в т.ч. мука, крупы, отруби, мучки), макаронные изделия, ржаные и пшеничные хлебобулочные изделия, мучные кондитерские изделия; зернобобовые культуры (в т.ч. горох, фасоль, соя, нут, чечевица, маш, чина, вика, люпин); Масличные культуры (в т.ч. соя, рапс, подсолнечник, лен) и продукты их переработки (в т.ч. жмыхи, шроты)	Массовая доля зеараленона	от 25 до 1600	При проведении двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб	
			7	14
			При проведении одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб	
			9	18
Корма и комбикорма для животных на основе зерновых, зернобобовых, масличных культур или продуктов их переработки		от 25 до 3200	При проведении двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб	
			7	14
			При проведении одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб	
			9	18

Исследование предела количественного определения, избирательности, устойчивости, характеристик градуировочных зависимостей было проведено в ходе внутрилабораторного эксперимента, организованного и подвергнутого анализу в соответствии с [6] в 2023 г в санитарно-гигиенической лаборатории ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск [5].

Исследование предела количественного определения проводилось для вида продукции с максимальной оценкой показателя повторяемости (наихудший случай). Полученные экспериментально оценки предела количественного определения не превышали нижней границы диапазона измерений методики.

По результатам исследования предела количественного определения, а также оценивания показателей точности на соответствующих уровнях испытаний установленный диапазон измерений является подтвержденным.

При исследовании избирательности оценена перекрестная чувствительность по отношению к следующим микотоксинам: α -зеараленол, β -зеараленол, Т-2 токсин, охратоксин А, фумонизин В1, афлатоксин В1.

Перекрестная чувствительность по отношению к α -зеараленолу, β -зеараленолу, составила 1 %, по отношению к остальным вышеупомянутым микотоксинам – менее 1 %.

Устойчивость методики исследована и подтверждена в отношении следующих

наиболее существенно влияющих на измерения параметров:

- температура всех стадий инкубации микротитровального планшета;
- время инкубации микротитровального планшета после добавления конъюгата;

- время инкубации микротитровального планшета после добавления субстрата.

Полученные оценки характеристик градуировочных зависимостей, построенных при проведении эксперимента, удовлетворяли следующим условиям:

- корень квадратный из коэффициента детерминации – не менее 0,94;
- абсолютное значение аналитической чувствительности, выраженной по отношению к натуральному логарифму массовой концентрации аналита – не менее 0,05;

- отношение максимального значения к минимальному значению аналитической чувствительности, выраженной по отношению к натуральному логарифму массовой концентрации аналита – не более 2.

2 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие ТНПА:

СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности;
СТБ ISO 5725-2-2022	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений;
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике;
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования;
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности;
ГОСТ OIML R 76–1–2011	Весы лабораторные. Общие технические требования;
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;
ГОСТ ISO 6497-2014	Корма. Отбор проб;
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия;
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия;
ГОСТ 13496.0-2016	Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб;
ГОСТ 13586.3-2015	Зерно. Правила приемки и методы отбора проб;
ГОСТ 13979.0-86	Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб;
ГОСТ 25336–82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
ГОСТ 26312.1-84	Крупа. Правила приемки и методы отбора проб;
ГОСТ 27668-88	Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб;
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой;

Примечание – При пользовании настоящей методикой измерений целесообразно проверить действие ссылочных ТНПА на официальном сайте Национального фонда ТНПА в глобальной компьютерной сети Интернет.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться действующими взамен ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Средства измерений, программное обеспечение, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

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

3.1 Средства измерений

3.1.1 При выполнении измерений применяют средства измерений, сведения о которых указаны в таблице 3.

Таблица 3 – Средства измерений

Тип, модель (модификация) средства измерений	Метрологические и технические характеристики
Фотометры автоматические серии ELx (модель ELx-800)	Спектральный диапазон от 450 до 700 нм. Фотометрический диапазон измерений от 0 до 2 Б. Пределы допускаемой абсолютной погрешности фотометра $\pm 0,02$ Б. Предел допускаемого среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности при измерении оптической плотности $\pm 0,005$ %.
Термометры стеклянные лабораторные ТЛ-2 (модификация ТЛ-2 №1)	Диапазон измеряемых температур: от минус 30 °С до 70 °С. Цена деления 1,0 °С. Пределы допускаемой абсолютной погрешности $\pm 1,0$ °С.
Термогигрометры UNITESS THB 1 (модификация THB 1B)	Диапазон измерений температуры от 0 °С до 50 °С. Диапазон измерений относительной влажности от 10 % до 90 %. Пределы допускаемой абсолютной погрешности термогигрометра при измерении температуры $\pm 0,5$ °С. Пределы допускаемой абсолютной погрешности термогигрометра при измерении относительной влажности $\pm 3,0$ %.
Весы лабораторные ВЛ (модификация ВЛ-220М)	Класс точности по ГОСТ OIML R 76-1: специальный; Максимальная нагрузка: 82 г/220 г. Минимальная нагрузка: 1 мг. Действительная цена деления: 0,01 мг/0,1 мг. Пределы допускаемой погрешности весов, в интервалах взвешивания от 0,001 г до 120 г включ., св. 50 г до 200 г включ., св. 200 г до 220 г включ.: $\pm 0,5$; $\pm 1,0$; $\pm 1,5$ мг соотв.
Секундомеры электронные «Интеграл С-01»	см. приложение А
Дозаторы механические Asura manual (модификации 825, 835, 855)	см. приложение А
Дозаторы бутылочные DLAB (модификация DispenseMate)	см. приложение А

3.1.2 Допускается применение других средств измерений с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных ниже:

а) фотометр для микропланшетов, обеспечивающий измерение на длине волны 450 нм с пределами погрешности измерения оптической плотности $\pm 0,02$ Б в диапазоне измерений от 0 до 0,4 Б и пределами относительной погрешности измерения оптической плотности ± 5 % в диапазоне измерений свыше 0,4 Б.

б) средство измерений для измерения температуры и влажности воздуха:
– с диапазоном измерений температуры, включающим диапазон от 15 °С до 25 °С, и пределами погрешности измерений температуры ± 1 °С;

– с диапазоном измерений относительной влажности, включающим диапазон от 15 % до 80 %, и пределами относительной погрешности измерений относительной влажности ± 3 %;

в) дозаторы с диапазоном объемов дозирования от 20 до 200 мм³ и пределами допускаемого относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0$ %;

г) дозаторы с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и пределами допускаемого относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5$ %;

д) дозаторы с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см³ и пределами допускаемого относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0$ %;

е) дозаторы с диапазоном объемов дозирования, включающим значение 25 см³ и пределами допускаемого относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального $\pm 2,5$ % или пипетки 1-2-25 по ГОСТ 29169;

ж) дозаторы многоканальные с диапазоном объемов дозирования от 50 до 350 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0$ %;

з) весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76–1 специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 220 г, ценой деления не более 0,0001 г;

и) термометр лабораторный частичного погружения с ценой деления 1 °С с диапазоном измерения, включающим в себя диапазон значений от минус 18 °С до 25 °С;

к) секундомер с диапазоном измерений от 1 мин до 60 мин и пределами погрешности измерений времени ± 2 с.

Для проведения работ согласно методике используют средства измерений, допущенные к применению в Республике Беларусь и прошедшие метрологическую оценку в установленном порядке.

3.2 Вспомогательные устройства, программное обеспечение

Шаблон для обработки результатов измерений средствами Microsoft® Office Excel версии не ниже 8.0 «Шаблон ИФА микотоксин–зеараленон», разработанный ООО «Альгимед Техно» – далее программное обеспечение.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 3000 об/мин (пробирки вместимостью 50 см³), например, LMC-3000, производства BioSan Ltd, Латвия.

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от 2 °С до 8 °С в холодильной камере и не более минус 18 °С в морозильной камере.

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

например MSV-3500, производства BioSan Ltd, Латвия.

Лабораторный шейкер, обеспечивающий частоту вращения до 250 об/мин, например, PSU-20i, производства BioSan Ltd, Латвия.

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

Мельница лабораторная, обеспечивающая измельчение с размером частиц не более 0,5 мм.

Сито лабораторное с размером ячеек 0,5 мм.

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

– инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от 20 °С до 25 °С с точностью ± 1 °С, например, Thermomixer comfort в комплекте с термоблоком для микротитровальных планшетов, производства Eppendorf AG, Германия;

– устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету от 100 мм³ до 350 мм³, например, 3D-IW8, производства BioSan Ltd, Латвия.

Допускается применение других вспомогательных устройств с техническими характеристиками не хуже указанных.

3.3 Материалы, реактивы, посуда

Пленка «парафильм» или скотч.

Микрофибровые салфетки для очистки оптических поверхностей.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Штатив для пробирок.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 50 см³.

Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью от 1,5 до 2,0 см³.

Колбы конические вместимостью 100 см³, 250 см³ по ГОСТ 25336.

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

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

Цилиндры мерные вместимостью 100; 250 см³ типа 3-100-2, 3-250-2 по ГОСТ 1770.

V-образные одноразовые ванночки для реагентов (для многоканальных дозаторов) вместимостью от 50 до 60 см³.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026 марки «ФМ» или фильтры, изготовленные из бумаги фильтровальной по ГОСТ 12026 марки «ФМ» (при отсутствии центрифуги).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизированная.

Растворы зеараленона для проведения контроля правильности, соответствующие требованиям 15.4.1. Допускается использование чистого зеараленона для приготовления растворов для проведения контроля правильности при обеспечении их соответствия требованиям 15.4.1.

Моющее средство (детергент), не содержащее ферментных или ингибирующих добавок. Рекомендуется использовать лабораторный детергент.

Набор реагентов «ИФА микотоксин-зеараленон» по [7]: набор реактивов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению зеараленона методом иммуноферментного анализа в составе (таблица 4).

Таблица 4 – Состав набора реагентов

Компонент набора	Количество в комплекте	
	Форма выпуска №1	Форма выпуска №2
Разборный микротитровальный планшет (иммуносорбент) с лунками, покрытыми антителами к зеараленону	1 шт. (6 стрипов по 8 лунок)	1 шт. (12 стрипов по 8 лунок)
Градуировочные растворы зеараленона с массовой концентрацией 0; 25; 100; 400; 1600 нг/см ³	5 × 1,0 см ³	5 × 2,0 см ³
Конъюгат	4 см ³	8 см ³
20-ти кратный концентрат промывочного раствора	15 см ³	30 см ³
Стоп-реагент	6 см ³	12 см ³
ТМБ субстрат	6 см ³	12 см ³
Буфер для разведения проб	15 см ³	30 см ³
Примечание – В таблице 4 указаны условные концентрации градуировочных растворов, численно равные массовой доле зеараленона, мкг/кг, в пробах, имеющих такие же массовые концентрации зеараленона в их растворах, подготовленных согласно 11.5, что и в соответствующих градуировочных растворах		

Допускается применение материалов и реактивов с характеристиками и по качеству не хуже указанных (кроме наборов реагентов).

4 Метод измерений

Измерения массовой доли зеараленона выполняют методом конкурентного колориметрического иммуноферментного анализа. Принцип метода основан на измерении оптической плотности растворов проб или градуировочных растворов в ходе проведения иммуноферментного анализа.

В ходе иммуноферментного анализа в лунки планшета, покрытого антителами к зеараленону, вместе с пробой или градуировочным раствором добавляют конъюгат зеараленона с пероксидазой хрена. Присутствующий в пробе зеараленон конкурирует с конъюгированным зеараленоном за связывание с антителами, нанесенными на стенки лунок. После добавления ТМБ субстрата, а затем стоп-реагента измеряется оптическая плотность раствора при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от массовой концентрации зеараленона в градуировочном растворе или растворе пробы. Массовая доля зеараленона в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием пяти градуировочных растворов.

Измерения согласно методике выполняют с получением одного либо двух результатов единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб.

5 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений массовой доли зеараленона соблюдают следующие 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, действующими в организации;
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационной документации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений;
- инструкции по технике безопасности при работе с зеараленоном, действующей в организации, использующей методику;
- инструкции (или иного документа) по сбору и утилизации используемых веществ, действующей в организации, использующей методику.

6 Требования к квалификации персонала, выполняющего измерения

К выполнению измерений и (или) обработке их результатов допускают лиц, имеющих высшее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой.

7 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

8 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

- температура окружающего воздуха должна быть от 20 °С до 25 °С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, необходимо помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце;
- при относительной влажности воздуха менее 40 % и наличии воздушных потоков с целью устранения возможности испарения содержимого лунок рекомендуется лунки покрывать пленой «парафильм» или заклеивать скотчем;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту методики, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например, в ящик стола.

9 Условия хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Микротитровальные планшеты должны храниться в плотно закрытой упаковке. Дополнительные рекомендации по хранению набора реагентов приведены в инструкции изготовителя [7].

10 Требования к отбору и хранению проб

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 27668,

ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13979.0, ГОСТ ISO 6497, ГОСТ 26312.1 и другим ТНПА на конкретные виды продукции. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С не более 2 сут или в замороженном виде при температуре не более минус 10 °С не более 14 сут. Перед проведением подготовки проб по 11.5 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от 2 °С до 8 °С. Упаковка образцов должна исключать попадание влаги при хранении.

11 Подготовка к выполнению измерений

11.1 Перечень работ, проводимых при подготовке к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы:

- выбор способа выполнения измерений;
- подготовка лабораторной посуды;
- подготовка набора реагентов;
- подготовка проб;
- подготовка оборудования.

11.2 Выбор способа выполнения измерений

Измерения согласно методике выполняют одним из двух способов:

- путем проведения двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб;
- путем проведения одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб.

Указанные выше способы выполнения измерений применяют ко всей серии измерений, т.е. к совокупности измерений оптической плотности градуировочных растворов и растворов проб, выполняемых одновременно согласно разделу 12.

Используемый способ выполнения измерений выбирают на основании требований, предъявляемых к точности измерений, стоимости и срокам выполнения измерений, а также информации о массовой доле зеараленона в образце (см. 13.2.1).

11.3 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой два раза и высушивают. Не допускается многократное использование одноразовой лабораторной посуды.

11.4 Приготовление растворов

11.4.1 Приготовление раствора метанола

В коническую колбу вместимостью 250 см³ приливают 30 см³ дистиллированной воды, отмеренные мерным цилиндром, затем приливают отмеренные мерным цилиндром 70 см³ метанола и перемешивают. Хранят раствор при температуре от 20 °С до 25 °С в плотно закрытой посуде из темного стекла не более 1 мес в соответствии с установленными правилами хранения метанола и его растворов.

11.5 Подготовка проб

11.5.1 Предварительная подготовка проб

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с разделом 10. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

Образцы зерна (семян), зернобобовых, макаронных, крупяных изделий, кормов и кормовых добавок измельчают с помощью лабораторной мельницы, просеивают через сито с размером ячеек 0,5 мм, и тщательно перемешивают. Если используемая лабораторная мельница не снабжена ситами, то после измельчения образец просеивают через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, остаток образца на сите снова измельчают на мельнице так, чтобы он весь прошел через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Образцы хлебобулочных изделий и мучных кондитерских изделий измельчают с помощью гомогенизатора и перемешивают, образцы муки (мукомольных изделий) – тщательно перемешивают.

11.5.2 Получение экстрактов проб

От гомогенизированного по 11.5.1 образца отбирают две параллельные навески массой 5,00 г, взвешенные с дискретностью 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³ или в конические колбы вместимостью 100 см³ и в каждую пробирку (колбу) добавляют отмеренные пипеткой или бутылочным дозатором 25 см³ раствора метанола, приготовленного по 11.4.1. Содержимое пробирки (колбы) встряхивают на шейкере 5 мин при частоте вращения от 200 до 250 об/мин или встряхивают вручную в течение 5 мин.

Пробирки центрифугируют при относительном центробежном ускорении 3000 g, в течение 5 мин. При отсутствии центрифуги надосадочную жидкость фильтруют с помощью бумажного фильтра в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³ или в конические колбы вместимостью 100 см³.

Подготовленные как описано выше экстракты проб используют для получения растворов проб согласно 11.5.3. При необходимости (см. 11.5.4) экстракты проб хранят при температуре от 20 °С до 25 °С не более 3 ч или при температуре не более минус 18 °С не более 1 мес. Охлажденные экстракты проб перед использованием доводят до температуры от 20 °С до 25 °С.

11.5.3 Получение растворов проб

Дозатором отбирают по 100 мм³ экстрактов проб, полученных по 11.5.2, и переносят в микроцентрифужные пробирки вместимостью от 1,5 до 2 см³. В пробирки добавляют по 300 мм³ буфера для разведения проб, отобранного дозатором, и перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 1 мин.

Полученные растворы проб используются для выполнения измерений согласно разделу 12. Допускается хранение растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С не более 1 ч.

Примечание – При выполнении измерений с получением результата одного единичного измерения для проб и градуировочных растворов от испытываемых образцов отбирают только одну навеску, при этом от образцов, предназначенных для контроля повторяемости по 13.3, отбирают по две параллельные навески.

11.5.4 Получение растворов проб с увеличенным фактором разбавления

Аликвоты экстрактов проб, подготовленных по 11.5.2, объемом 50 мм³ переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью от 1,5 до 2 см³, добавляют к ним 350 мм³ буфера для разведения проб, после чего перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 1 мин.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 1 ч.

11.6 Подготовка набора реагентов

11.6.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 30 мин, доводят температуру остальных реагентов от 20 °С до 25 °С.

При работе необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты набора реагентов.

Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать остатки реагентов обратно в оригинальные флаконы.

11.6.2 Подготовка микротитровального планшета

При проведении двух единичных измерений растворов проб количество лунок микротитровального планшета, необходимых для проведения измерений N_w , рассчитывают по формуле

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

где N_{SMP} – количество одновременно измеряемых образцов;

10 – количество лунок для градуировочных растворов.

При проведении одного единичного измерения растворов проб количество лунок микротитровального планшета, необходимых для проведения измерений, рассчитывают по формуле

$$N_w = N_{SMP} + N_{Or} + 5, \quad (2)$$

где N_{SMP} – количество одновременно измеряемых образцов;

N_{Or} – количество дополнительных лунок для проведения контроля повторяемости согласно 13.3.

5 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленными в соответствии с 11.6.1, 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 ее и хранят в соответствии с разделом 9.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят согласно схеме, предлагаемой программным обеспечением, с учетом выполнения по два единичных измерения (по одному единичному измерению) градуировочных растворов

и растворов проб.

Не рекомендуется одновременно использовать более шести стрипов. Допускается выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно при выполнении требований 12.2.

11.6.3 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную дозатором аликвоту 20-тикратного концентрата промывочного раствора объемом от 1 до 9 см³ приливают в коническую колбу вместимостью 250 см³ и добавляют отмеренную мерным цилиндром вместимостью 100 см³ или 25 см³ (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 19 раз больше, чем объем концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 см³, то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³. Полученный раствор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 6 нед в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

11.7 Подготовка оборудования

Подготовку оборудования к работе, включение и выведение на рабочий режим осуществляют согласно его эксплуатационной документации.

12 Порядок выполнения измерений

12.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с 11.5. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с 11.6.

12.2 Требования при выполнении ИФА при использовании более шести стрипов одновременно

При использовании формы выпуска №2 набора реагентов «ИФА микотоксин-зеараленон», допускается выполнение ИФА более чем с шестью стрипами одновременно.

Для этого внесение конъюгата по 12.3.2, ТМБ-субстрата по 12.3.5, стоп-реагента по 12.3.7 проводят с использованием многоканального дозатора. Отбор указанных выше реагентов многоканальным дозатором производят из предварительно наполненных отбираемым раствором одноразовых ванночек для реагентов.

При этом не допускается:

- выливать реагент из одноразовой ванночки обратно во флакон;
- использовать одноразовую ванночку повторно.

12.3 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

12.3.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно 11.6.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 100 мм³ каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания массовых концентраций градуировочных растворов (0; 25; 100; 400;

1600 нг/см³). Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 100 мм³ двух параллельных проб каждого образца.

При проведении одного единичного измерения для градуировочных растворов и растворов проб в лунки вносят по одной аликвоте этих растворов в порядке, описанном выше.

12.3.2 Добавление конъюгата

В каждую лунку микротитровального планшета вносят отобранные дозатором 50 мм³ конъюгата. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола.

12.3.3 Инкубация планшета

Помещают планшет в инкубатор при температуре от 20 °С до 25 °С и инкубируют в течение 10 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 10 мин в помещении при условиях, указанных в разделе 8.

12.3.4 Промывка планшета

По окончании инкубации выливают содержимое лунок планшета путем его резкого переворачивания. Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм³ промывочного раствора, приготовленного по 11.6.3, и затем, по истечении 15 с, выливая его резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – 3, объем заливаемого моющего раствора – 250 мм³, время выдержки (замачивания) – 15 с.

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

12.3.5 Добавление ТМВ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТМВ–субстрата, после чего сразу же начинают отсчет времени инкубации. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола.

Не допускается выливать обратно в оригинальный флакон остатки субстрата во избежание его контаминации.

12.3.6 Инкубация планшета

Планшет помещают в инкубатор при температуре от 20 °С до 25 °С и инкубируют в течение 10 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 10 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 8.

12.3.7 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в лунки планшета добавляют по 100 мм³ стоп-реагента, отмеренных дозатором, и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

12.3.8 Измерение оптической плотности

Сразу же после перемешивания вытирают микрофибровой салфеткой нижнюю

наружную поверхность лунок планшета и измеряют оптическую плотность лунок планшета с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с эксплуатационной документацией фотометра не позднее 5 мин после добавления стоп-реагента по 12.3.7.

13 Порядок обработки результатов измерений

13.1 Расчет массовой доли в пробах

Результаты измерений оптической плотности, введенные оператором при помощи интерфейса пользователя программного обеспечения, обрабатываются следующим образом.

Программное обеспечение выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B_0 от натурального логарифма массовой концентрации зеараленона вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (3)$$

где B – оптическая плотность раствора зеараленона;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с массовой концентрацией зеараленона 0 нг/см^3 ;

C – массовая концентрация зеараленона в растворе, нг/см^3 .

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар * значений $B_i/B_0, \ln C_i$ полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i = 2..5$), C_i – массовая концентрация i -го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум * значениям результатов измерений оптической плотности i -го градуировочного раствора.

Массовая доля зеараленона в пробе, X , мкг/кг ; рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right) \cdot F, \quad (4)$$

где B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления, $F=1$ для растворов проб, полученных по 11.5.3, и $F=2$ для растворов проб, полученных по 11.5.4.

При получении для образца кормов и комбикормов для животных на основе зерновых, зернобобовых, масличных культур или продуктов их переработки только одного результата единичного измерения массовой доли зеараленона в пробе, превышающего 1600 мкг/кг , дальнейшая обработка таких результатов измерений не выполняется, если для таких проб не проводилось разбавление по 11.5.4. Вместо этого получают раствор пробы с увеличенным фактором разбавления по 11.5.4 и выполняют его измерение согласно разделу 12.

* или одного значения при проведении одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб

13.2 Расчет и интерпретация окончательного результата измерений

13.2.1 Расчет и интерпретация окончательного результата измерений при проведении одного единичного измерения

При получении одного результата единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб расчет и интерпретацию окончательного результата измерений проводят следующим образом.

Полученный результат единичного измерения округляют до трех значащих цифр.

Если полученный результат единичного измерения оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 1, то окончательный результат измерений представляют в форме односторонней оценки массовой доли зеараленона в образце согласно 14.3.

Если полученный результат единичного измерения оказывается меньше, чем значение нижней границы диапазона измерений, указанное в разделе 1, то окончательный результат измерений представляют в форме односторонней оценки массовой доли зеараленона в образце согласно 14.2.

В остальных случаях за окончательный результат измерений принимают полученное значение результата единичного измерения пробы образца при положительном результате контроля повторяемости по 13.3, проведенном для образцов, предназначенных для контроля повторяемости. Окончательный результат измерений округляют до трех значащих цифр.

Если окончательный результат измерений превышает 70 % от предельно допустимого содержания зеараленона, установленного в соответствующих ТНПА, измерение образца согласно разделу 12 повторяют с выполнением двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб.

13.2.2 Расчет и интерпретация окончательного результата измерений при получении двух результатов единичных измерений

При получении двух результатов единичных измерений градуировочных растворов и растворов параллельных проб рассчитывают среднее арифметическое \bar{X} , мкг/кг, результатов двух измерений параллельных проб по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (5)$$

где X_1, X_2 – результаты измерений массовой доли зеараленона в параллельных пробах, мкг/кг.

Рассчитанное значение \bar{X} округляют до трех значащих цифр.

Если полученное значение \bar{X} для образцов кормов и комбикормов для животных превышает 1600 мкг/кг и разбавление проб по 11.5.4 не проводилось, то дальнейшая обработка результатов измерений не выполняется. Вместо этого получают растворы проб с увеличенным фактором разбавления по 11.5.4 и выполняют их измерение согласно разделу 12.

Если полученное значение \bar{X} оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, указанное в разделе 1, то окончательный результат измерений представляют в форме односторонней оценки массовой доли зеараленона в образце согласно 14.3.

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается меньше, чем значение нижней границы диапазона измерений, указанное в разделе 1, то окончательный

результат измерений представляют в форме односторонней оценки массовой доли зеараленона в образце согласно 14.2.

В остальных случаях проводят контроль повторяемости по 13.3, и, при получении положительного результата контроля, за окончательный результат измерений принимают значение \bar{X} , полученное, как указано выше.

13.3 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 для следующих результатов измерений:

- при проведении двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб – для результатов измерений всех образцов;
- при проведении одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб – для результатов измерений образцов, предназначенных для контроля повторяемости.

При проведении проверки 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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (6)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое \bar{X} , рассчитанное по формуле (5).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (7)$$

где r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 5, %;
 \bar{X} – среднее арифметическое результатов измерений параллельных проб одного образца, мкг/кг.

При невыполнении условия (6) проводят повторные измерения согласно разделу 12:

- при проведении двух единичных измерений градуировочных растворов и растворов проб – только образца, для которого получен отрицательный результат контроля;
- при проведении одного единичного измерения градуировочных растворов и растворов проб – всех образцов, входящих в данную серию измерений.

При получении одного единичного результата измерения градуировочных растворов и растворов проб в серии измерений должно быть не менее одного образца для контроля повторяемости.

Все результаты обработки результатов измерений, в том числе промежуточных, подлежат регистрации в соответствии с порядком, установленным в системе менеджмента лаборатории.

14 Форма представления результатов измерений

14.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности

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

$$(\bar{X} \pm U(X)), \text{ мкг/кг}$$

при уровне доверия $P = 0,95$, $k=2$

где \bar{X} – результат измерений, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 13;

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

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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (8)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, полученного в соответствии с методикой, %, приведенная в таблице 1.

При необходимости может быть проведено оценивание расширенной неопределенности измерений, выполняемых в соответствии с методикой при ее реализации в конкретной лаборатории.

14.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли с использованием нижней границы диапазона измерений

Если окончательный результат измерений оказывается меньше, чем значение нижней границы диапазона измерений, то дается односторонняя оценка массовой доли зеараленона в образце

$$\text{менее } X_{LL} \text{ мкг/кг,}$$

где X_{LL} – значение нижней границы диапазона измерений, приведенное в разделе 1, мкг/кг.

14.3 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой доли с использованием верхней границы диапазона измерений

Если окончательный результат измерений оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, то дается односторонняя оценка массовой доли зеараленона в образце

$$\text{более } X_{HL} \text{ мкг/кг,}$$

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

15 Контроль точности результатов измерений

Контроль точности измерений выполняется с периодичностью, установленной системой менеджмента 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.

15.1 Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Контроль повторяемости выполняется после измерения массовой доли зеараленона при расчете окончательного результата измерений по результатам двух измерений параллельных проб в соответствии с 13.3.

15.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

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

Лаборатория получает два результата измерений \bar{X}_1, \bar{X}_2 одного образца согласно разделу 12, варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости по 13.3. За результат измерений принимают среднее арифметическое двух результатов \bar{X}_1, \bar{X}_2

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (9)$$

при их соответствии условию

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abc}, \quad (10)$$

где CD_{abc} – абсолютное значение критической разности, мкг/кг, которое рассчитывают по формуле

$$CD_{abc} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (11)$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 5, %.

15.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

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

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 12 и получает результаты измерений \bar{X}_1 и \bar{X}_2 , рассчитанные по результатам измерений двух параллельных проб (двух единичных измерений) одного образца, обеспечивая контроль повторяемости по 13.3.

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

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} \quad (12)$$

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

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_R, \quad (13)$$

то оба результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (12), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (14)$$

где $\bar{\bar{X}}$ – среднее арифметическое результатов измерений двух лабораторий, мкг/кг;
 k – коэффициент, равный 1,7;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблице 5.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 5 СТБ ИСО 5725-6.

Таблица 5 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Количество единичных измерений	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн.}$, %
По два единичных измерения градуировочных растворов и растворов проб	13	13	16
По одному единичному измерению градуировочных растворов и растворов проб		–	–

15.4 Контроль правильности

15.4.1 Образцы для контроля правильности

Контроль правильности производят путем измерения образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением массовой доли зеараленона. Контроль правильности проводится с использованием добавок зеараленона, а также естественно или искусственно контаминированных образцов, имеющих приписанное значение массовой доли зеараленона (например, матричные стандартные образцы). Неопределенность приписанного значения массовой доли зеараленона в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

При использовании добавок ОК представляют собой навеску пробы образца, не содержащего зеараленона, в которую внесена добавка раствора зеараленона. Используемые при этом образцы до внесения добавки должны быть предварительно

гомогенизированы до однородного состояния и сохранять однородность состава и консистенции в течение всего предполагаемого срока хранения.

Оценка массовой доли зеараленона в подготовленных таким образом образцах без добавки должна быть не более значения, соответствующего градуировочному раствору с массовой концентрацией 25 нг/см³. Требуемые значения оценок массовой доли в образцах рассчитывают по формуле (5) на основании полученных согласно разделу 12 результатов измерений двух параллельных проб каждого такого образца без проведения контроля повторяемости по 13.3 и интерпретации результатов по 13.2. Допускается получение вышеуказанных значений оценок в образцах без добавки с помощью другой аттестованной (стандартизированной) методики, имеющей соответствующий предел измерения (обнаружения). В качестве образцов, в которые вносятся добавки, могут быть также использованы контрольные (референсные) образцы, свойства которых, в том числе приписанное изготовителем значение массовой доли зеараленона, соответствуют указанным выше условиям.

Добавку вносят непосредственно в пробирки с навесками проб. Приписанное значение массовой доли зеараленона X_{am} , мкг/кг, в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (15)$$

где C_{ST} – массовая концентрация раствора зеараленона, нг/см³;
 V_{ST} – объем добавленного раствора зеараленона, см³;
 m – масса навески пробы, г.

Приписанное значение массовой доли зеараленона в пробе с добавкой должно находиться в пределах от 35 % до 100 % верхней границы диапазона измерений методики.

Для внесения добавки используется раствор зеараленона, приготовленный из зеараленона в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Допускается использовать для внесения добавок готовые растворы, при условии, что относительная стандартная неопределенность добавленной массовой доли не превышает 3 %. Значение массовой концентрации зеараленона в растворе для добавки должно обеспечивать нахождение приписанных значений массовой доли зеараленона в пробе с добавкой в указанном выше диапазоне.

15.4.2 Проведение контрольной процедуры

Получают два параллельных результата измерений (два результата единичных измерений) ОК в соответствии с требованиями раздела 12.

За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой доли зеараленона $\overline{X_K}$ в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (5) при выполнении условия повторяемости по 13.3.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X_K} - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{\text{отн}} \cdot X_{am}, \quad (16)$$

где $K_{\text{отн}}$ – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 5;

X_{am} – приписанное значение массовой доли зеараленона в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (16) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

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

С помощью КК контролируют следующие показатели точности:

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

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [8] и СТБ ИСО 5725-6, раздел 6.

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

Примечание – При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы практические данные, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики может быть заявлено только в том случае, если показатели повторяемости и промежуточной прецизионности, рассчитанные по полученным лабораторией данным, статистически не превышают установленных в разделе 1 значений.

Для построения и ведения R-карт в качестве ОК могут использоваться рабочие образцы.

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора зеараленона, приготовленного из стандарта зеараленона в соответствии с прилагаемой инструкцией. Предварительно установленная массовая доля зеараленона в данных пробах без добавки должна быть менее нижней границы диапазона измерений методики. Рекомендуется вносить добавку зеараленона в ОК на уровне значений его массовой доли в рабочих пробах, ограничивая ее пределами от 35 % до 100 % верхней границы диапазона измерений методики.

При построении КК используют результаты измерений образцов, полученные при выполнении двух параллельных определений.

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

Рассчитывают значения центральной линии $d_2 \cdot \sigma_r$, %, предупреждающих границ UCL_1 , %, и границ регулирования UCL_2 , %, по следующим формулам

$$UCL_1 = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (17)$$

$$UCL_2 = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (18)$$

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (19)$$

где σ_r – относительное стандартное отклонение повторяемости, %, приведенное в таблице 1.

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

Ведение КК предусматривает набор данных X_1, X_2 при выполнении испытаний ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчета фактических относительных значений размаха $W, \%$, по формуле (20), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (20)$$

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

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [8].

Оценку стандартного отклонения повторяемости S_r за контролируемый период получают по формуле (21)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N W_i / N}{d_2}, \quad (21)$$

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

d_2 – коэффициент, $d_2 = 1,128$.

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

Рассчитывают значение центральной линии \overline{Rec} , %, по формуле

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (22)$$

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 зеараленона, по формуле

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (23)$$

где X_i – массовая доля зеараленона в пробе с добавкой, полученная в ходе i -го измерения, мкг/кг;

X_{exp} – рассчитанное значение массовой доли зеараленона в пробе с добавкой, мкг/кг.

Рассчитывают значение верхней предупреждающей границы UCL_1 , %, и нижней предупреждающей границы LCL_1 , %, по формулам

$$UCL_1 = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL_1 = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}. \quad (24)$$

Рассчитывают значение верхней границы регулирования UCL_2 , %, и нижней границы регулирования LCL_2 , %, по формулам

$$UCL_2 = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC}, \quad LCL_2 = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC}, \quad (25)$$

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

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}}. \quad (26)$$

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

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений X_i при выполнении испытаний ОК в соответствии с методикой, расчета фактических значений коэффициента извлечения Rec_i по формуле (23), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [8].

Приложение А
(справочное)
Метрологические характеристики средств измерений

Таблица А.1 – Метрологические характеристики дозаторов пипеточных

Диапазон показаний объемов дозирования, мм ³	Диапазон измерений объемов дозирования, мм ³	Номинальный объем дозы, мм ³	Пределы допускаемого относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального, %	Предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения фактического объема дозы при доверительной вероятности P=0,95, %	Дискретность установки объема дозы, мм ³
Дозатор механический Asura manual (модификация 825)					
от 20,0 до 200,0		20,0	±2,0	3,0	0,2
		100,0	±1,5	2,0	
		200,0	±1,5	2,0	
от 100 до 1000		100	±1,5	2,0	1
		500	±1,0	1,0	
		1000	±1,0	1,0	
Дозатор механический Asura manual (модификация 835)					
от 1000 до 10000		1000	±2,0	1,0	10
		5000	±1,1	1,0	
		10000	±1,0	1,0	
Дозатор механический Asura manual (модификация 855)					
от 40,0 до 350,0		40,0	±2,0	3,0	0,4
		175,0	±1,5	2,0	
		350,0	±1,5	2,0	

Таблица А.2 – Метрологические характеристики дозаторов бутылочных

Диапазон показаний объемов дозирования, см ³	Диапазон измерений объемов дозирования, см ³	Номинальный объем дозы, см ³	Пределы допускаемого относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального, %	Предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения фактического объема дозы при доверительной вероятности P=0,95, %	Дискретность установки объема дозы, см ³
Дозатор бутылочные DLAB (модификация DispenseMate)					
от 5,0 до 50,0		5,0	±5,0	5,0	1,0
		25,0	±2,0	2,0	
		50,0	±1,0	1,0	

Таблица А.3 – Метрологические характеристики секундомера

Наименование метрологической характеристики	Значение
Диапазон измерений интервалов времени в режиме секундомер, с	от 0,00 до 35999,99
Дискретность отсчета интервалов времени в режиме секундомер, с	0,01
Пределы допускаемой основной абсолютной погрешности измерения в режиме секундомера в нормальных условиях эксплуатации $(25 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$, с	$\pm(9,6 \cdot 10^{-6} \cdot T_x + 0,01)$
Пределы допускаемой дополнительной абсолютной погрешности измерения в режиме секундомера, вызванной отклонением температуры окружающего воздуха от нормальных условий $(25 \pm 5) \text{ }^\circ\text{C}$ в интервале рабочих температур от минус $10 \text{ }^\circ\text{C}$ до $50 \text{ }^\circ\text{C}$ на $1 \text{ }^\circ\text{C}$ изменения температуры, с	$\pm(2,2 \cdot 10^{-6} \cdot T_x)$
где T_x - значение измеренного интервала времени, с.	

Библиография

- [1] Правила разработки и применения методик (методов) измерений, утвержденные постановлением Госстандарта от 23 апреля 2021 г. № 44
- [2] Методические рекомендации по оформлению методик (методов) измерений, утвержденные постановлением Госстандарта от 01.06.2021 № 61
- [3] Положение о допуске единиц величин к применению в Республике Беларусь, утвержденное Постановлением Совета министров Республики Беларусь от 24.11.2020 № 673
- [4] VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, V.J. Barwick, and S.L.R. Ellison, LGC/VAM/1998/088
(Проект VAM 3.2.1 Развитие и гармонизация принципов неопределенности измерений. Часть (d): Протокол для оценки неопределенности по данным валидации)
- [5] Отчет по результатам проведения исследований по оцениванию рабочих характеристик методики измерений «Массовая доля зеараленона в пищевой продукции, кормах, кормовых добавках и сырье для их производства. Методика измерений методом ИФА с использованием тест-систем «ИФА микотоксин-зеараленон»
- [6] Eurachem Guide «The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics», Second edition, 2014
(Руководство Еврахим «Пригодность для использования аналитических методов. Руководство для лабораторий по валидации методов и сопутствующим вопросам», второе издание, 2014)
- [7] ТУ ВУ 193208315.039-2022 Набор реагентов для определения содержания микотоксина зеараленона в зерновых, зернобобовых и масличных культурах и продуктах их переработки методом иммуноферментного анализа «ИФА микотоксин-зеараленон»
- [8] ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта

