

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Альгимед»

Г.Е. Батура

«17» сентября 2018 г.



**ПРОДУКЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.
КОРМА.**

**Методика измерений содержания хлорамфеникола (левомецетина)
методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов
MaxSignal Chloramphenicol (CAP) ELISA Test Kit и ИФА антибиотик-
хлорамфеникол**

МИ 1013-3-2018

Москва 2018

ПРЕДИСЛОВИЕ

1 РАЗРАБОТАНА Обществом с ограниченной ответственностью «ООО «Альгимед»» (ООО «ООО «Альгимед»») «14» сентября 2018 г.

2 АТТЕСТОВАНА Федеральным бюджетным учреждением «Государственный региональный центр стандартизации, метрологии и испытаний в г. Москве» (ФБУ «Ростест-Москва») «20» сентября 2018 г.

3 УТВЕРЖДЕНА «17» сентября 2018 г. приказом Генерального директора ООО «ООО «Альгимед»» № 112 от «17» сентября 2018 г.

СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ от «20» сентября 2018 г. № 2430/420-РА.RU/311703-2018 выдано ФБУ «Ростест-Москва»

СВЕДЕНИЯ О РЕГИСТРАЦИИ ФР.1.39.2018.31343

СОДЕРЖАНИЕ

1	ВВОДНАЯ ЧАСТЬ	5
1.1	Назначение и область применения методики измерений	5
2	НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	5
3	ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ	6
4	ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ УСТРОЙСТВАМ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ	7
5	МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ	10
6	ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ	11
6.1	Общие требования безопасности	11
6.2	Требования к квалификации операторов	11
7	УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ	11
7.1	Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении	11
7.2	Условия хранения набора реагентов	12
8	ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ	12
8.1	Отбор образцов	12
8.2	Подготовка лабораторной посуды	12
8.3	Приготовление растворов	12
8.3.1	Экстракционный буфер для образцов	12
8.3.2	Моющий раствор	13
8.4	Подготовка проб	13
8.4.1	Подготовка проб корма	13
8.5	Подготовка набора реагентов	14
8.5.1	Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов	14
8.6	Подготовка микротитровального планшета	14
9	ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ	15
9.1	Общие требования	15
9.2	Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа	15
9.2.1	Внесение градуировочных растворов и растворов проб	15
9.2.2	Добавление раствора конъюгата	15
9.2.3	Инкубация планшета	15
9.2.4	Промывка планшета	15
9.2.5	Добавление ТМБ-субстрата	16

9.2.6	Повторная инкубация.....	16
9.2.7	Завершение реакции окрашивания.....	16
9.2.8	Измерение оптической плотности	16
10	ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ	16
10.1	Расчет массовой концентрации хлорамфеникола	16
10.2	Критерии правильности выполнения измерений	17
10.3	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	18
11	ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	18
11.1	Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности	18
11.2	Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием предела измерения	19
11.3	Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием значения верхней границы диапазона измерений.....	19
12	КОНТРОЛЬ ТОЧНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ	19
12.1	Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости.....	20
12.2	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности	20
12.3	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости	20
12.4	Контроль правильности.....	21
12.4.1	Образцы контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой	21
12.4.2	Проведение контрольной процедуры	22
12.5	Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)	22
	БИБЛИОГРАФИЯ	24

1 ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Назначение и область применения методики измерений

Настоящая методика распространяется на корма и устанавливает метод конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания хлорамфеникола (левомицетина).

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации хлорамфеникола с использованием набора реагентов MaxSignal® для определения хлорамфеникола, (MaxSignal® Chloramphenicol (CAP) ELISA Test Kit) производства BIOO Scientific Corporation (США), или набора реагентов ИФА антибиотик-хлорамфеникол производства ООО «Компания Альгимед» (Республика Беларусь), далее набор реагентов.

2 НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей методике использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 12026–76 «Бумага фильтровальная лабораторная. Общие технические требования»

ГОСТ 24104–2001 «Весы лабораторные. Общие технические требования»

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 6709–72 «Вода дистиллированная. Технические условия»

ГОСТ 8.010–99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения»

ГОСТ 9293–74 «Азот газообразный и жидкий. Технические условия»

ГОСТ 12.1.004–91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования»

ГОСТ 12.2.003–91 «Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности»

ГОСТ 1770–74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия»

ГОСТ 29169–91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой»

ГОСТ 29227–91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования»

ГОСТ ISO 6497–2014 «Корма. Отбор проб»

ГОСТ 13496.0–2016 «Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб»

ГОСТ Р ИСО 5725–2–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений»

ГОСТ Р ИСО 5725–4–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений»

ГОСТ Р ИСО 5725–6–2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике»

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящей методикой измерений целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по действующему «Указателю национальных стандартов» и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящей рекомендацией следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Диапазон измерений методики составляет:

– для кормов – от 0,1 до 7,5 мкг/кг;

Предел измерения для данной методики составляет:

– для кормов – 0,1 мкг/кг;

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой концентрации хлорамфеникола в указанном выше диапазоне с показателями точности, указанными в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей промежуточной прецизионности повторяемости

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}, \%$	Относительная суммарная стандартная неопределенность $U_c, \%$
Корма	0,1 – 7,5	10,6	8

В результате оценки показателя правильности для данной методики была установлена незначимость смещения во всем диапазоне измерений.

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

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

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность U_c , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K=2, P=95$ %
Корма	0,1 – 7,5	8	16

Указанные в таблице 1 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с:

- показатели прецизионности – ГОСТ Р ИСО 5725-2;
- показатели правильности – [1];
- оценки неопределенности – [1], [2].

4 ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ УСТРОЙСТВАМ, МАТЕРИАЛАМ, РЕАКТИВАМ

При проведении испытаний применяются следующие средства измерений:

– весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 500 г, ценой деления не более 0,01 г;

– автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более ± 5 %), например, EMax Plus, производства Molecular Devices LLC, США;

– термометр лабораторный частичного погружения класса точности 1 с ценой деления 1°С по ГОСТ 28498;

– дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников, например, Asuga manual 825, Asuga manual 835, Asuga manual 855-производства Socorex ISBA S. A., Швейцария:

с диапазоном объемов дозирования от 10 до 100 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,5$ %;

с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5$ %;

с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0$ %;

многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального не более $\pm 2,0$ %.

- колбы мерные 2-100-2 или 3 - 100 - 2 по ГОСТ 1770;
- колбы КН-1-100-14/23, КН-1-250-24/29, 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;
- цилиндры мерные 2-25-1.2-50-1, 2-250-1 по ГОСТ 1770;

Вспомогательное оборудование и приспособления, расходные материалы:

- центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (пробирки вместимостью 15 см³), например, Rotofix 32A, производства Hettich Lab Technology Aps., Германия;
- лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, например, MSV-3500, производства BioSan Ltd, Латвия;
- лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин, например, термошейкер PST-60HL, производства BioSan Ltd, Латвия;
- гомогенизатор лабораторный типа ULTRA-TURRAX производства IKA® Werke GmbH & Co. K.G (Германия), например Ultra Turrax DI 25 Digital, или бытовой блендер;
- роторный испаритель в комплекте с водяной баней, обеспечивающей поддержание температуры 60 °С с точностью ± 5 °С, например, Pei-VAP Value/GI, производства Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Германия, или другая испарительная система, позволяющая поддерживать указанную температуру;
- баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры 40, 60, 80 °С с точностью ± 5 °С, например, WB-4MS производства BioSan Ltd, Латвия;
- холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 до плюс 8 °С в холодильной камере и не выше минус 20 °С в морозильной камере;
- пробирки для центрифугирования из полипропилена вместимостью 15 см³;
- пробирки стеклянные вместимостью 5 см³ типа П-1-5-0,1 ХС или 10 см³ типа 11-2-10-14/23 ХС по ГОСТ 1770;
- бумага фильтровальная ФБ-Ш по ГОСТ 12026.

Использование следующего оборудования, программного обеспечения и вспомогательных материалов не является обязательным, но рекомендуется для увеличения производительности и повышения точности анализа:

– шаблон Excel для обработки результатов «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработан BIOO Scientific Corporation (США)

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

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

– пленка «парафильм» или скотч;

– шпатели пластиковые;

– штатив для пробирок;

– микрофибровые салфетки, например, Ullrafine 30x30, производства Maruni Optical Co. Ltd;

Реактивы:

– вода, дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода деионизированная;

– лабораторный детергент, например, Triton X-100.

– азот газообразный повышенной чистоты 1 сорт по ГОСТ 9293.

– этилацетат ч.д.а. по ГОСТ 22300.

– Н-гексан ч.д.а. по [3].

– ацетонитрил с массовой долей основного вещества 99,9 %, например, ацетонитрил т.ч. по [5];

– хлорамфеникол с массовой долей основного вещества не менее 98 %;

– набор реагентов MaxSignal® для определения хлорамфеникола. (MaxSignal® Chloramphenicol (CAP) ELISA Test Kit) производства BIOO Scientific Corporation (США) или ИФА Антибиотик – Хлорамфеникол, производства ООО «Альгимед» (Республика Беларусь), состоящие из реактивов и микротитровального планшета, необходимых для выполнения измерений по определению содержания хлорамфеникола методом иммуноферментного анализа. Состав наборов реагентов приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав наборов реагентов

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами к хлорамфениколу)	1 шт.

Компонент набора	Количество в комплекте
Градуировочные растворы хлорамфеникола с концентрацией 0 нг/см ³ , 0,015 нг/см ³ , 0,030 нг/см ³ , 0,150 нг/см ³ , 0,500 нг/см ³ , 1,500 нг/см ³	6 шт. × 1,8 см ³
Конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена	8,0 см ³
10×концентрат экстракционного буфера для образцов	25 см ³
20×концентрат промывочного раствора	28 см ³
Стоп-реагент	20 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Экстракционный буфер А	20 см ³
Экстракционный буфер В	20 см ³
Буфер для доведения проб	6 см ³
Концентрат экстракционного буфера для хлорамфеникола (смесь солей)*	30 г

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера в наборах реагентов производства BIOO Scientific Corporation:

- 10× концентрат экстракционного буфера для образцов;
- 20× концентрат промывочного раствора;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат.

Допускается использовать другие средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование по метрологическим и техническим характеристикам, а материалы и реактивы (кроме наборов реагентов) по качеству не хуже указанных.

5 МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

Используемый метод основан на конкурентном колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки планшета, покрытого антителами к хлорамфениколу, вместе с раствором пробы или градуировочным раствором добавляют конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой хрена. Присутствующий в пробе хлорамфеникол конкурирует с конъюгированным пероксидазой хлорамфениколом за связывание с антителами на стенках лунки. Интенсивность окраски, образующейся после добавления ТМБ субстрата, обратно пропорциональна концентрации хлорамфеникола в растворе. Оптическая плотность растворов измеряется при 450 нм. Массовая концентрация хлорамфеникола в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

6 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ

6.1 Общие требования безопасности

При выполнении работ в соответствии с данной методикой персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте 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, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений.

6.2 Требования к квалификации операторов

К проведению работ по данной методике допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа.

7 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

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

7.1 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 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, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце;

– при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков с целью устранения возможности испарения содержимого лунок рекомендуется покрывать планшеты пленой «парафильм» или заклеивать скотчем;

– в особых случаях, которые оговорены по тексту методики измерений, требуется помещать планшеты в защищенное от света место, например, в ящик стола.

7.2 Условия хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке.

Микротитровальные планшеты должны храниться в плотно закрытой упаковке. Дополнительные рекомендации по хранению набора реагентов приведены в инструкции производителя.

8 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

8.1 Отбор образцов

Отбор образцов кормов проводят по ГОСТ ISO 6497 «Корма. Отбор проб» или ГОСТ 13496.0 «Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб» или иному НД, установленному на предприятии. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 20 °С в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб по п. 8.4 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

8.2 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе лабораторного детергента промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой 2 раза и высушивают.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ:

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

8.3 Приготовление растворов

8.3.1 Экстракционный буфер для образцов

Аликвоту 10×концентрата экстракционного буфера для образцов, отмеренную дозатором или пипеткой, переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ в зависимости от объема аликвоты, добавляют в 9 раз больший объем дистиллированной воды, отмеренный цилиндром, и перемешивают. Объем аликвоты концентрата, необходимый для приготовления

экстракционного буфера для анализа N_{smp} образцов в двух параллелях (по две навески из каждого образца), составляет: $(0,28 \cdot N_{smp} + 0,1) \text{ см}^3$

Раствор используют свежеприготовленным.

8.3.2 Моющий раствор

Аликвоту $20 \times$ концентрата моющего раствора, отмеренную мерным цилиндром, переносят в коническую колбу вместимостью 500 см^3 или 1000 см^3 , приливают отмеренную мерным цилиндром дистиллированную воду, объем которой в 19 раз больше объема аликвоты концентрата, и перемешивают. Объем аликвоты концентрата выбирается в зависимости от предполагаемого количества анализируемых образцов и составляет от 10 до 28 см^3 . Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 до плюс $8 \text{ }^\circ\text{C}$ не более 1 месяца в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

8.4 Подготовка проб

8.4.1 Подготовка проб корма

Образец корма, отобранный в соответствии с п. 8.1, гомогенизируют.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой $2,00 \text{ г}$, взвешенные с точностью до $0,01 \text{ г}$, и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 . В пробирки с пробами добавляют отмеренные пипеткой или дозатором 6 см^3 этилацетата и перемешивают на вортексе на максимальной скорости в течение 3 мин.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от 20 до $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 4000 g , в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетатный слой) объемом 3 см^3 , и переносят ее в новые пробирки. Выпаривают этилацетат из пробирок на роторном испарителе или в токе азота на водяной бане при температуре $(60 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ досуха. Может использоваться другая испарительная система, обеспечивающая испарение при $60 \text{ }^\circ\text{C}$ в токе инертного газа.

К сухому остатку в пробирках добавляют 2 см^3 н-гексана и отмеренный дозатором экстракционный буфер для образцов, приготовленный по п. 8.3.1 объемом 1 см^3 и перемешивают на вортексе в течение 2 мин на максимальной скорости.

Затем пробирки центрифугируют в следующем режиме: от 20 до $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 4000 g , в течение 10 мин.

С помощью пипетки Пастера или дозатора удаляют верхний гексановый слой. Дозатором отбирают в чистую пробирку на $1,5 - 2,0 \text{ см}^3$ 100 мм^3 нижнего водного слоя. Требуется осторожность, чтобы не захватить остатки гексана на границе раздела фаз. Дозатором в ту же пробирку вносят 400 мм^3 экстракционного буфера для образцов, приготовленного по п. 8.3.1 и тщательно встряхивают.

Полученные водные растворы проб используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С в течение двух часов.

8.5 Подготовка набора реагентов

8.5.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета, выдерживают при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С от 1 до 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 до плюс 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 обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемых при проведении измерений в соответствии с п. 9.

8.6 Подготовка микротитровального планшета

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

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

где N_{SMP} – количество образцов;

12 – количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные в соответствии с п. 8.5.1, 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 7.2.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят согласно схеме, предлагаемой шаблоном Excel «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System» (или удобным для исполнителя образом, если расчет осуществляется с помощью других программных средств или вручную), с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и образцов.

Не рекомендуется одновременно использовать более шести стрипов. Если необходимо провести измерение более 18 образцов. ИФА выполняется несколько раз.

9 ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

9.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 8.4. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с п. 8.5.

9.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

9.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 8.6, вносят дозатором по 100 мм³ каждого градуировочного раствора в две параллельные лунки. Внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0,00; 0,015; 0,030; 0,150; 0,500; 1,500 нг/см³). В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят дозатором по 100 мм³ растворов каждой параллельной пробы анализируемых образцов.

9.2.2 Добавление раствора конъюгата

Во все лунки микротитровального планшета добавляют по 50 мм³ раствора конъюгата. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

9.2.3 Инкубация планшета

Сразу после перемешивания помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С и инкубируют в течение 60 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в течение 60 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.1.

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

9.2.4 Промывка планшета

Промывают планшет 3 раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм³ моющего раствора, приготовленного по п. 8.2.3 и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмытки 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.

9.2.5 Добавление ТМБ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки планшета добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТМБ-субстрата, после чего сразу же засекают время начала инкубации. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

НЕ ДОПУСКАЕТСЯ выливать обратно в оригинальный флакон остатки ТМБ-субстрата во избежание его контаминации.

9.2.6 Повторная инкубация

Помещают планшет в инкубатор при температуре от плюс 20 до плюс 25 °С и инкубируют в течение 20 мин. При отсутствии инкубатора микротитровальный планшет инкубируют в помещении в защищенном от света месте при соблюдении условий, указанных в разделе 7.1. По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении).

9.2.7 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в каждую лунку вносят по 100 мм³ стоп-раствора и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

9.2.8 Измерение оптической плотности

Немедленно 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 инструкцией по эксплуатации прибора.

10 ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ

10.1 Расчет массовой концентрации хлорамфеникола

Шаблон Excel «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанный BIOO Scientific Corporation (США), далее «шаблон» производит обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса шаблона.

Шаблон выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B_0 от натурального логарифма концентрации хлорамфеникола вида

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (2)$$

где B – оптическая плотность раствора хлорамфеникола;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией хлорамфеникола 0,00 нг/см³;

C – концентрация хлорамфеникола в растворе, нг/см³.

a, b – коэффициенты линейной регрессии.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК на основании пар значений $B_i/B_0, \ln C$, полученных для пяти градуировочных растворов, где ($i = 2 \dots 6$), C_i – концентрация i -го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям оптической плотности параллельных измерений i -го градуировочного раствора.

Концентрация хлорамфеникола в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x - a}{b}\right), \quad (3)$$

где X – концентрация хлорамфеникола в пробе, мкг/кг:

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы, для пробы кормов в соответствии с данной МИ равен 5.

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

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (4)$$

Где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой концентрации хлорамфеникола в параллельных пробах, мкг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до третьего десятичного знака после запятой.

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается меньше, чем предел измерений X_{LQ} , равный 0,1 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием предела измерения согласно п. 11.2.

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, равное 7,5 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 11.3.

10.2 Критерии правильности выполнения измерений

Измерения считаются выполненными правильно, если:

- оптическая плотность в лунках с градуировочным раствором с концентрацией $0 \text{ нг/см}^3 \geq 0,6$
- коэффициент корреляции для полученного калибровочного графика $r \geq 0,95$ (при использовании шаблона рассчитывается автоматически).

10.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р 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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (5)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение \bar{X} , рассчитанное по формуле (4).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (6)$$

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

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

При невыполнении условия (5) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

11 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

11.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде $(\bar{X} \pm U(X))$, мкг/кг при доверительной вероятности $P = 0,95$, $K=2$,

где \bar{X} – результат измерений, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 10;

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

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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (7)$$

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

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

11.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием предела измерения

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ} , равный 0,1 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

менее X_{LQ} ,

где X_{LQ} — значение предела измерений, приведенное выше.

11.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой концентрации хлорамфеникола с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если окончательный результат измерений \bar{X} оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{HL} , равное 7,5 мкг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации хлорамфеникола в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

более X_{HL} ,

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

12 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.

12.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации хлорамфеникола при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 10.3.

12.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725–6 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений \bar{X}_1 , \bar{X}_2 , согласно разделу 9, варьируя факторы промежуточной прецизионности оператор, время и обеспечивая контроль повторяемости по п. 10.3. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов \bar{X}_1 , \bar{X}_2 ,

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (8)$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abc}, \quad (9)$$

где CD_{abc} – абсолютное значение критической разности, мг/кг, рассчитываемое по формуле

$$CD_{abc} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (10)$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 4, %.

При невыполнении условия (9) выявляют причины и принимают меры для устранения неудовлетворительного результата контроля, после чего повторно проводят измерения текущей серии образцов.

12.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725–6 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 9 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 10.3.

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

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (11)$$

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,

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abc}, \quad (12)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (11), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (13)$$

где $\bar{\bar{X}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений двух лабораторий, мкг/кг;

k – коэффициент, равный 1,3;

CD – относительное значение критической разности, % приведенное в таблице 3.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 6 ГОСТ Р ИСО 5725–6.

Таблица 4 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Критическая разность CD , %	Норматив контроля правильности $K_{отн}$, %
Корма	27,44	22	19

12.4 Контроль правильности

Контроль правильности при определении массовой концентрации хлорамфеникола производится путем анализа образцов для контроля (ОК) с заранее известным значением концентрации вещества (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок хлорамфеникола. Неопределенность значения массовой концентрации хлорамфеникола в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

12.4.1 Образцы контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая концентрация хлорамфеникола в которой менее предела измерения данной

методики измерений, в которую внесена добавка раствора хлорамфеникола. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации хлорамфеникола X_{am} , мкг/кг, в пробе с добавкой рассчитывается по формуле

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (14)$$

где C_{ST} – концентрация хлорамфеникола в растворе, нг/см³;

V_{ST} – объем добавляемого раствора, см;

m – масса навески пробы, г.

Величина массовой концентрации хлорамфеникола в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из хлорамфеникола в соответствии с рекомендациями производителя. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы) хлорамфеникола, при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации хлорамфеникола в них не превышает 3 %.

12.4.2 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений образцов контроля в соответствии с требованиями раздела 9. За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой концентрации хлорамфеникола \bar{X}_k в образцах контроля, мкг/кг, рассчитанный по формуле (11) при выполнении условия повторяемости по п. 10.3.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_k - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \bar{X}_k, \quad (15)$$

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

X_{am} – рассчитанное значение массовой концентрации хлорамфеникола в образцах контроля, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (15) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

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

С помощью КК контролируют 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 КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [4] и ГОСТ Р ИСО 5725–6, раздел 6.

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

П р и м е ч а н и е – При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы данные измерений, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики может быть заявлено только в том случае, если показатель повторяемости, рассчитанный по накопленным лабораторией данным, статистически не превышает установленных методикой значений.

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

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками стандартного раствора. Предварительно установленная массовая концентрация хлорамфеникола в данных пробах без добавки должна быть менее предела обнаружения, декларируемого производителем набора реагентов. Рекомендуется вносить добавку хлорамфеникола в образцы для контроля на уровне массовых концентраций в рабочих пробах.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [4].

БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization 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
- [2] ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения
- [3] ТУ 2631-003-05807999-98 Реактивы. Н-гексан
- [4] ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Статистические методы. Контрольные карты Шухарта
- [5] ТУ 2636-092-44493179-04 Ацетонитрил (нитрил уксусной кислоты, метилцианид)