

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора БелГИМ
по науке


Т.А. Копомиец
« 28 » 2013 г.



УТВЕРЖДАЮ

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


З.В. Ловкис
« 10 » 2013 г.



Определение содержания глиаина в продуктах питания с
использованием тест-системы "Ridascreen[®] Глиадин" производства

R-Biopharm, Германия

Методика выполнения измерений

МВИ.МН 4658-2013

МВИ аттестована
РУП "Белорусский государственный
институт метрологии"

Свидетельство об аттестации
№ 782 / 2013
от " 28 " 06 2003 г.

РАЗРАБОТАНО

Республиканский контрольно-
испытательный комплекс по качеству и
безопасности продуктов питания
РУП «Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси
по метрологии»



И.М. Почицкая

2013 г.

Минск 2013

СОДЕРЖАНИЕ

1	Область применения	4
2	Точность измерений	4
3	Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование	5
4	Метод измерений	7
5	Требования безопасности и квалификации операторов	8
5.1	Требования к безопасности	8
5.2	Требования к квалификации оператора	8
6	Условия измерений	8
7	Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении	8
8	Условия хранения набора реагентов	9
9	Подготовка к выполнению измерений	9
9.1	Отбор образцов	9
9.2	Подготовка помещения и лабораторной посуды	9
9.3	Приготовление растворов	10
9.3.1	Приготовление буфера для разбавления проб	10
9.3.2	Приготовление раствора конъюгата антител с пероксидазой	10
9.3.3	Приготовление раствора промывочного буфера	11
9.3.4	Приготовление 80%-го раствора этилового спирта	11
9.3.5	Приготовление 68%-го раствора изопропилового спирта	11
9.4	Подготовка проб	11
9.4.1	Экстрагирование с применением коктейля Мендеса	12
9.4.2	Экстрагирование с применением RIDA [®] раствора для экстрагирования	12
9.5	Подготовка тест-системы	12
9.5.1	Предварительная подготовка и правильное обращение с тест-системой	12
9.5.2	Подготовка микротитровального планшета	13
10	Проведение измерений	13
10.1	Общие сведения	13
10.2	Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа	13
10.2.1	Внесение градуировочных растворов и растворов проб	13
10.2.2	Инкубация планшета	14
10.2.3	Промывка планшета	14
10.2.4	Добавление раствора конъюгата	14
10.2.5	Повторная инкубация	14
10.2.6	Повторная промывка планшета	14
10.2.7	Внесение субстрата и хромогена	14
10.2.8	Заключительный этап инкубации	15
10.2.9	Завершение реакции окрашивания	15
10.2.10	Измерение оптической плотности	15
11	Обработка результатов измерений	15
11.1	Расчет массовой концентрации глиаина	15
11.2	Проверка приемлимости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	16



12	Оформление результатов измерений	16
12.1	Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности	16
12.2	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой концентрации глиаина с использованием предела обнаружения	17
12.3	Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой концентрации глиаина с использованием значения верхней границы диапазона измерений	17
13	Контроль точности результатов измерений	17
13.1	Оперативный контроль результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	17
13.2	Проверка приемлимости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости	17
13.3	Контроль правильности результатов измерений	19
13.3.1	<i>Образцы для контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой</i>	19
13.3.2	<i>Проведение контрольных процедур</i>	19
13.4	Контроль стабильности результатов измерений	19
13.4.1	<i>Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта</i>	19
13.4.2	<i>Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация контрольных карт размахов для контроля стабильности СКО повторяемости</i>	20
13.4.3	<i>Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности</i>	20
14	Нормативные ссылки	22
15	Библиография	22



1 Область применения

Настоящая методика распространяется на готовые пищевые продукты, относящиеся к пищевым продуктам диетического (лечебного и профилактического) питания, замаркированные производителями, как не содержащие глютен или с низким содержанием глютена (кондитерские мучные изделия, хлебо-булочные изделия, мясорастительные консервы для детского питания, сухие смеси для детского питания, включая молокосодержащие, мясные продукты, сухое молоко), а также на сырье и ингредиенты, которые используются для производства или приготовления пищевых продуктов диетического (лечебного и профилактического) питания, замаркированные производителями, как не содержащие глютен или с низким содержанием глютена (рис, кукуруза, кукурузная мука, рисовая мука, соевая мука, крупа из риса и кукурузы) и устанавливает метод иммуноферментного анализа (ИФА) для определения содержания проламина пшеницы (глиадина).

Методика предназначена для проведения измерений массовой концентрации глиадина с использованием тест-системы "Ридаскрин® Глиадин" (Ridascreen® Gliadin) арт. № R7001 производства фирмы R-Biopharm (Германия), далее тест-система.

Диапазон измерений методики составляет от 5 мг/кг до 40 мг/кг.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010.

2 Точность измерений

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

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости

Виды продукции	Диапазон измерений, мг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение внутрилабораторной воспроизводимости σ_R , %
Матрица I (кондитерские мучные изделия)	5,0 – 40,0	5,2	9,6
Матрица II (хлебо-булочные изделия)	5,0 – 40,0	3,7	8,3
Матрица III (мясорастительные консервы для детского питания)	5,0 – 40,0	5,6	9,0
Матрица IV (кукуруза, кукурузная мука, крупа из кукурузы)	5,0 – 40,0	8,0	8,2
Матрица V (рис, рисовая мука, крупа из риса)	5,0 – 40,0	3,3	10,2
Матрица VI (сухие смеси для детского питания, включая молокосодержащие)	5,0 – 40,0	5,2	11,6
Матрица VII (мука соевая)	5,0 – 40,0	2,5	11,1
Матрица VIII (сухое молоко)	5,0 – 40,0	3,5	9,0
Матрица IX (мясные продукты)	5,0 – 40,0	7,2	8,4

В результате оценки показателя правильности для данной методики была установлена значимость смещения во всём диапазоне измерений. Установленная оценка

смещения учитывается при определении оценок относительной суммарной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности.

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

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

Виды продукции	Диапазон измерений, мг/кг	Относительная стандартная суммарная неопределенность u_c , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K=2$, $P=95$ %
Матрица I (кондитерские мучные изделия)	5,0 – 40,0	10,0	20,0
Матрица II (хлебо-булочные изделия)	5,0 – 40,0	10,0	20,0
Матрица III (мясорастительные консервы для детского питания)	5,0 – 40,0	10,0	20,0
Матрица IV (кукуруза, кукурузная мука, крупа из кукурузы)	5,0 – 40,0	11,0	22,0
Матрица V (рис, рисовая мука, крупа из риса)	5,0 – 40,0	11,0	22,0
Матрица VI (сухие смеси для детского питания, включая молочкосодержащие)	5,0 – 40,0	12,0	24,0
Матрица VII (мука соевая)	5,0 – 40,0	12,0	24,0
Матрица VIII (сухое молоко)	5,0 – 40,0	9,0	18,0
Матрица IX (мясные продукты)	5,0 – 40,0	9,0	18,0

Указанные в таблицах 1, 2 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента, проведенного на базе одной лаборатории в соответствии с:

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

3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы

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

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания до 220 г, ценой деления не более 0,0001 г.

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более $\pm 5\%$).

Програмное обеспечение RIDA[®] SOFT Win, разработанное R-Biopharm специально для тест-систем Ridascreeen[®].

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

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая ускорение не менее 2500 g.

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



Лабораторный орбитальный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин.

Гомогенизатор, лабораторный блендер или мельница.

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

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

Дозаторы пипеточные переменного объема с комплектом одноразовых наконечников:

- с диапазоном объемов дозирования от 20 до 200 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 2 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 1,5 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 1000 до 5000 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 1 %;
- с диапазоном объемов дозирования от 2000 до 10000 мм³ и относительной погрешностью дозирования не более 1 %;
- многоканальный (восьмиканальный) с диапазоном объемов дозирования от 30 до 300 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm (2,0 - 1,5)$ %.

Оборудование, использование которого не является обязательным, но рекомендуемым для увеличения производительности и повышения точности анализа:

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью ± 1 °С или хладотермостат, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью ± 1 °С;
- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микроювету от 100 мм³ до 350 мм³.

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

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

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

Колбы мерные вместимостью 100 см³, 2-100-2 или 3-100-2 по ГОСТ 1770.

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

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

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

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

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

Пипетки 1-2-20, 1-2-25 по ГОСТ 29169.

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

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода деионизированная.

Молоко сухое обезжиренное по СТБ 1858

RIDA[®] раствор для экстрагирования (арт. R7099, пр-ва R-Biopharm) для подготовки проб.

Спирт изопропиловый (2-пропанол) по ГОСТ 9805.

Коктейль Мендеса для экстрагирования (арт. R7006, пр-ва R-Biopharm) для подготовки проб.

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

Препарат глиадин с сертифицированным содержанием вещества, например PWG Gliadin с концентрацией глиадин 93,9 % или другой препарат с аналогичными свойствами.

Бумага фильтровальная ФБ-III по ГОСТ 12026.

Пленка «парафильм» или скотч.

Шпатели пластиковые.

Штативы для пробирок и одноразовых наконечников.

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Тест-система "Ридаскрин[®] Глиадин" (Ridascreen[®] Gliadin) производства фирмы R-Biopharm (Германия), арт. №: R7001 – набор реактивов, градуировочных растворов и микротитровальный планшет, необходимые для выполнения измерений по определению содержания проламина пшеницы (глиадин) в продуктах питания методом иммуноферментного анализа. Состав тест-системы приведен в таблице 3.

Таблица 3 – Состав тест-набора Ridascreen[®] Глиадин для определения глиадина

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет с 96 лунками, сенсibilизированный антителами к глиадину (12 стрипов по 8 лунок)	1 шт
Градуировочным растворы глиадин с концентрацией: 0 мкг/кг (нулевой градуировочный раствор), 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг, 40 мкг/кг, 80 мкг/кг	6 шт × 1,3 см ³
Концентрат конъюгата (антитела, конъюгированные пероксидазой хрена) (красная крышка)	1 шт × 1,2 см ³
Субстрат (содержит пероксид мочевины) (зеленая крышка)	1 шт × 7,0 см ³
Хромоген (содержит тетраметилбензидин) (синяя крышка)	1 шт × 7,0 см ³
Стоп-реагент (содержит 1н серную кислоту) (желтая крышка)	1 шт × 14,0 см ³
5×концентрат буфера для разведения проб	1 шт × 60,0 см ³
10×концентраи моющего буфера	1 шт × 100,0 см ³
Примечание – в состав тест-системы также входят сертификат качества и инструкция на немецком и английском языках (по запросу фирма поставщик предоставляет инструкцию на русском языке). В сертификате качества прописаны исходные данные по тест-системе, срок годности, оптические плотности градуировочных растворов и градуировочная кривая, полученные при проверке данной партии тест-системы в 8 лабораториях.	

4 Метод измерений

Используемый метод основан на колориметрическом иммуноферментном анализе. В ходе анализа антиген (глиадин) растворов проб или градуировочных растворов взаимодействует с антителами адсорбированными на поверхности лунок микротитровального планшета, что приводит к образованию комплекса антиген-антитело. Несвязанный антиген удаляется на стадии промывки, затем вносятся ферментно маркированные антитела (конъюгат). Конъюгат антител связывается с комплексом антиген-антитело с образованием комплекса антитело-антиген-антитело+фермент (сэндвич). После повторной промывки несвязанные ферментно маркированные антитела удаляются, в лунки дозируется субстрат и хромоген. Связанный с антителами фермент окрашивает бесцветный хромоген в голубой цвет, причем интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству образованных первичных комплексов антиген-антитело и вторичных антитело-антиген-антитело+фермент. Затем добавляется стоп реагент, который меняет цвет растворов на желтый различной интенсивности. Оптическая плотность полученных растворов измеряется при 450 нм, она прямо пропорциональна количеству глиадина в исследуемых образцах.

Массовая концентрация глиадина в образцах определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Требования к безопасности



При выполнении работ по определению массовой концентрации глиаина обслуживающий 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, изложенными в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений.

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

Моющий буфер содержит тимерасол, при работе с ним необходимо использовать средства индивидуальной защиты (маска, очки и перчатки), избегать контакта с кожей. При попадании буфера на кожу или слизистые оболочки следует немедленно промыть их большим количеством воды.

5.2 Требования к квалификации операторов

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

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

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

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов в помещении

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

- температура воздуха в помещении должна быть от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- не должно происходить попадания прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на которую помещают планшет, рекомендуется подкладывать под планшет теплоизоляционный материал, например бумажное полотенце;
- при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков рекомендуется на время инкубации покрывать планшет пленкой «парафильм» или заклеивать скотчем с целью устранения возможного испарения содержимого лунок; а также попадания в лунки планшета глиаиносодержащей пыли во время инкубации.
- на время инкубации следует помещать планшет в защищенное от света место, например в ящик стола.

8 Условия хранения набора реагентов



Хранение тест-системы осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Замораживание реагентов тест-системы не допускается. Микротитровальный планшет с неиспользованными стрипами (лунками) хранят в плотно закрытом оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся осушителем. После использования все оставшиеся реагенты немедленно охлаждают до температуры от плюс 2 °С до плюс 8 °С. Следует, по возможности, ограничить количество извлечений из холодильника и доведения до комнатной температуры тест-системы, если ИФА выполняется несколько раз. Для этого целесообразно одновременно проводить анализ не менее 10 проб (используется 4 стрипа), что уменьшает количество нагреваний тест-системы до 3 раз. Тест-систему с истекшим сроком годности не используют. Замена отдельных реагентов тест-системы на реагенты из наборов других партий не допускается.

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

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

Не следует использовать реагенты, имеющие следующие признаки порчи:

- голубая окраска раствора хромогена до внесения его в лунки;
- оптическая плотность для градуировочного раствора 1 больше 0,15 ($E_{450\text{nm}} > 0,15$), что может свидетельствовать о контаминации раствора глиадином;
- оптическая плотность меньше 0,6 ($E_{450\text{nm}} < 0,6$) для градуировочного раствора 6 с концентрацией 80 мкг/кг.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

Отбор и подготовку образцов к испытанию проводят в соответствии с нормативной документацией на данный вид продукции согласно СТБ 1036. Образцы в невскрытой продовольственной таре или образцы, отобранные в герметичную упаковку, хранятся в соответствии с условиями хранения, вынесенными на этикетку либо согласно условиям хранения данного вида продукции. Вскрытые образцы, образцы с нарушением целостности упаковки дальнейшему хранению не подлежат из-за возможного загрязнения глиадином.

9.2 Подготовка помещения и лабораторной посуды

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

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

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

Запрещается:



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

9.3 Приготовление растворов

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

9.3.1 Приготовление буфера для разбавления проб

Буфер для разбавления проб поставляется в концентрированном виде (5-кратный концентрат). Для приготовления рабочего раствора буфера для разбавления проб отмеренную дозатором аликвоту концентрата буфера для разбавления проб объемом от 1 до 5 см³ приливают в колбу вместимостью 100 см³ и добавляют отмеренную дозатором дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 4 раза больше, чем объем концентрата буфера для разбавления проб (например, 3 см³ концентрированного буфера плюс 12 см³ дистиллированной воды).

Объем используемой аликвоты V_b , см³ концентрата буфера для разбавления проб рассчитывается на основании количества анализируемых проб по формуле

$$V_b = \frac{V \cdot N_{smp} + V_1}{5} \quad (1)$$

где N_{smp} – количество анализируемых проб,

V – количество концентрата буфера для разбавления проб, см³ (от 1 до 5 см³),

V_1 – количество рабочего раствора буфера для разбавления проб, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 5 см³),

5 – кратность концентрата буфера для разбавления проб.

Раствор не хранится и готовится непосредственно перед проведением ИФА.

9.3.2 Приготовление раствора конъюгата антител с пероксидазой

Конъюгат антител поставляется в концентрированном виде (11-кратный концентрат). Перед приготовлением раствора конъюгата осторожно встряхивают флакон с концентратом. Для приготовления рабочего раствора конъюгата в стеклянную пробирку вместимостью 5 см³ или 10 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата конъюгата объемом не менее 200 мм³, добавляют дозатором в 10 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата конъюгата объем дистиллированной воды (например, смешивают 200 мм³ концентрата конъюгата плюс 2 см³ дистиллированной воды). Тщательно перемешивают содержимое пробирки путем 3-4-х кратного набора и слива жидкости из дозатора.

Объем используемой аликвоты V_c , мм³, концентрата конъюгата антител рассчитывается на основании количества анализируемых проб по формуле

$$V_c = \frac{1200 + 200 \cdot N_{smp} + V_2}{11} \quad (2)$$

где N_{smp} – количество исследуемых проб,

1200 – количество рабочего раствора конъюгата антител, вносимого в 12 лунок, занимаемых градуировочными растворами, мм³,

200 – количество рабочего раствора конъюгата антител, вносимого в две параллельные лунки для каждого образца, мм³,

V_2 – количество рабочего раствора антител, приготавливаемого в запас, мм³ (не менее 400 мм³),

11 – кратность концентрата конъюгата антител.

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

9.3.3 Приготовление раствора промывочного буфера

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

Для приготовления раствора промывочного буфера отмеренную цилиндром аликвоту концентрата промывочного буфера объемом 50 или 100 см³ приливают в колбу вместимостью 500 или 1000 см³ и добавляют отмеренную цилиндром вместимостью 1000 см³ дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 9 раз больше, чем объем концентрата промывочного буфера (например 100 см³ концентрированного промывочного буфера плюс 900 см³ дистиллированной воды). Полученный раствор промывочного буфера может храниться при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в течение месяца.

9.3.4 Приготовление 80% раствора этилового спирта

Мерным цилиндром отмеряют 83,33 см³ 96% этилового спирта и 19,67 см³ дистиллированной воды, переносят в колбу и тщательно перемешивают. Раствор хранят в плотно закрытой емкости при комнатной температуре не более 3-х месяцев.

При использовании этилового спирта иной концентрации, чем 96%, объем используемой аликвоты V_E , см³, спирта рассчитывается по формуле:

$$V_E = \frac{80 \cdot V_{100}}{C_E} \quad (3)$$

где C_E – концентрация этилового спирта, %;

V_{100} – объем мерного цилиндра или колбы (100 см³).

9.3.5 Приготовление 68% раствора изопропилового спирта

Мерным цилиндром отмеряют 68 см³ изопропилового спирта и 32 см³ дистиллированной воды, переносят в колбу и тщательно перемешивают. Раствор хранят в плотно закрытой емкости при комнатной температуре не более 3-х месяцев.

9.4 Подготовка проб

При пробоподготовке важно соблюдать условия, изложенные в п. 9.2. Также необходимо работать под вытяжкой, поскольку коктейль Мендеса и RIDA[®] раствор для экстрагирования содержат β-меркаптоэтанол.

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

- Твердые образцы (рис, кукуруза, крупа из риса и кукурузы). Навеску образца (минимум 5 г) тщательно гомогенизируют с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или блендера лабораторного до порошкообразного состояния.
- Образцы с неоднородным распределением глютена (кондитерские мучные изделия, хлебо-булочные изделия, мясорастительные консервы для детского питания, мясные продукты). В таких образцах глютен может быть распределен очень неравномерно, поэтому для обеспечения представительности анализа отбирают и гомогенизируют минимум 50 г пробы.
- Для порошкообразных образцов (кукурузная и рисовая мука, сухие смеси для детского питания, включая молокосодержащие, молоко сухое) дополнительная пробоподготовка не требуется.

9.4.1 Экстрагирование с применением коктейля Мендеса



Смешивают в пробирке $(0,250 \pm 0,001)$ г гомогенизированной пробы и $2,5 \text{ см}^3$ коктейля Мендеса.

Пробирки закрывают завинчивающимися крышками, интенсивно встряхивают вручную переворачивая для равномерного распределения пробы и тщательно перемешивают на лабораторном вортексе в течение 30 с при 1800 об/мин.

Инкубируют пробирки на водяной бане в течение 40 мин. при температуре 50°C .

В охлажденные до комнатной температуры пробирки вносят $7,5 \text{ см}^3$ 80%-го раствора этилового спирта приготовленного по п. 9.3.4, закрывают крышку и снова тщательно перемешивают на лабораторном вортексе.

Встряхивают пробирки в течение 60 мин на лабораторном орбитальном шейкере для пробирок при комнатной температуре.

Пробирки центрифугируют при не менее 2500 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

Аликвоту надосадочной жидкости в количестве 80 мм^3 переносят в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой и добавляют 920 мм^3 приготовленного раствора буфера для разбавления проб по п. 9.3.2. Содержимое пробирок перемешивают на вортексе.

Итоговый фактор разбавления 500.

Для анализа используют 100 мм^3 раствора исследуемых образцов на лунку планшета.

9.4.2 Экстрагирование с применением RIDA[®] раствора для экстрагирования

Смешивают в пробирке $(0,250 \pm 0,001)$ г пробы и $2,5 \text{ см}^3$ RIDA[®] раствора для экстрагирования.

Пробирки закрывают завинчивающимися крышками, интенсивно встряхивают вручную переворачивая для равномерного распределения пробы и тщательно перемешивают на лабораторном вортексе в течение 30 с при 1800 об/мин.

Инкубируют пробирки на водяной бане в течение 15 мин при температуре 60°C .

В охлажденные до комнатной температуры пробирки вносят $7,5 \text{ см}^3$ 68%-го раствора изопропилового спирта, приготовленного по п. 9.3.5, закрывают крышку и снова тщательно перемешивают на лабораторном вортексе в течение 30 с.

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

Пробирки центрифугируют при не менее 2500 g в течение 10 мин при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C .

Аликвоту надосадочной жидкости в количестве 80 мм^3 переносят в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой и добавляют 920 мм^3 приготовленного раствора буфера для разбавления проб (п. 9.3.2). Содержимое пробирок перемешивают на вортексе.

Итоговый фактор разбавления 500.

Для анализа используют 100 мм^3 раствора исследуемых образцов на лунку планшета.

9.5 Подготовка тест-системы

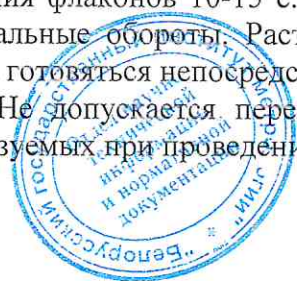
9.5.1 Предварительная подготовка и правила обращения с тест-системой

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

При работе следует исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты тест-системы.

Перед использованием жидкие реагенты следует перемешать путем осторожного вращения флаконов 10-15 с. Для этих целей можно использовать вортекс, настроенный на минимальные обороты. Растворы из концентрированных реагентов, кроме промывочного буфера готовятся непосредственно перед проведением ИФА.

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



9.5.2 Подготовка микротитровального планшета

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

$$N_w = 12 + 2 \cdot N_{smp} \quad (4)$$

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

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленные соответствии с п.9.5.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w . Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 8.

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

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

10 Проведение измерений

10.1 Общие сведения

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.4 и пп. 9.4.1, 9.4.2. Компоненты тест-системы подготавливают в соответствии с п. 9.5. При постановке ИФА соблюдают условия, изложенные в п. 7. Прецизионность результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмытки планшета в процессе анализа, а также от правильного дозирования всех жидкостей. Дозирование градуировочных растворов необходимо проводить начиная от меньших концентраций к большим, меняя наконечники дозаторов. При работе с дозаторами, во избежание разбрызгивания, недолива, недобора жидкостей необходимо руководствоваться инструкциями и правилами работы с данными устройствами. В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета. На всех стадиях инкубации избегают воздействия прямого солнечного света.

10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

10.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета, размеченного согласно п. 9.5.2, вносят дозатором по 100 мм³ каждого градуировочного раствора в две параллельные лунки. Внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов (т.е. 0 мкг/кг, 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг, 40 мкг/кг, 80 мкг/кг). В соответствующие лунки микротитровального планшета вносят дозатором по 100 мм³ каждого раствора проб в две параллельные лунки.

10.2.2 Инкубация планшета

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.



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

10.2.3 Промывка планшета

Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 раствора промывочного буфера, приготовленного по п. 9.3.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

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

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

10.2.4 Добавление раствора конъюгата

Во все лунки микротитровального планшета добавляют по 100 мм^3 раствора конъюгата, приготовленного по п. 9.3.2. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 сек.

10.2.5 Повторная инкубация

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

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

10.2.6 Повторная промывка планшета

Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм^3 раствора промывочного буфера, приготовленного по п. 9.3.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

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

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

10.2.7 Внесение субстрата и хромогена

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора во все лунки микротитровального планшета добавляют по 50 мм^3 раствора субстрата и по 50 мм^3 раствора хромогена. Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 30 сек.

10.2.8 Заключительный этап инкубации

Помещают планшет в инкубатор или хладотермостат при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора или хладотермостата микротитровальный планшет инкубируют в течение 30 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7. Хромоген светочувствителен, поэтому на данном этапе особое внимание следует уделить тому, чтобы планшет инкубировался в защищенном от света месте.

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

10.2.9 Завершение реакции окрашивания

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

Бумажной салфеткой вытирают нижнюю наружную поверхность лунок планшета.

10.2.10 Измерение оптической плотности

В течение 10 мин после добавления стоп-реагента необходимо измерить оптическую плотность лунок планшета. Оптическую плотность измеряют с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора. При работе фотометра следует исключить прямое попадание солнечных лучей на прибор, так как это может привести к неверным результатам измерения. Если используемая модель фотометра совместима с программным обеспечением RIDA[®] SOFT Win (далее программное обеспечение), то управление прибором осуществляется через интерфейс программы.

11 Обработка результатов измерений

11.1 Расчет массовой концентрации глиаина

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

- Построение градуировочной зависимости концентрация глиаина – относительная оптическая плотность.
- Расчет фактического значения массовой концентрации глиаина в пробах на основании рассчитанного значения относительной оптической плотности и задаваемого оператором фактора разбавления.

При оценке значений измеренной оптической плотности руководствуются следующими правилами:

- Оптическая плотность в лунке с нулевым стандартом не должна быть больше 0,15, в противном случае это свидетельствует о недостаточной отмывке планшета или о контаминации. В случае если величина оптической плотности, измеренной в лунке с 6-м стандартом, не превышает 0,6, это является признаком порчи реагентов.

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

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

где X_1, X_2 – результаты двух измерений массовой концентрации глиаина в параллельных пробах, мг/кг, полученные при помощи программного обеспечения.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

Примечание – для оценки содержания глютена в исследуемом образце, полученное по формуле (5) значение $\bar{X}$, наряду с умножением на фактор разбавления (как минимум 500), умножается на 2 (постоянная поправка), так как глютен состоит из глиаина и глютеина в соотношении 1:1. Полученное содержание глютена является приблизительной оценкой.

11.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях



повторяемости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Рассчитывают расхождение между результатами измерений 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 значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (5).

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

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

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

r – относительное значение предела повторяемости, %, приведено в таблице 5.

При невыполнении условия (6) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(\bar{X})), \text{ мг/кг} \quad (8)$$

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

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

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

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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X} \quad (9)$$

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

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



12.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки массовой концентрации глиаина с использованием предела обнаружения

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

менее X_{DL} .

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

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

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается большим, чем значение верхней границы диапазона измерений, равный 40 мг/кг, то дается односторонняя оценка массовой концентрации глиаина в образце с использованием предела измерений

более X_{HL} .

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

13 Контроль точности результатов измерений

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

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

13.1 Оперативный контроль результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

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

13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости

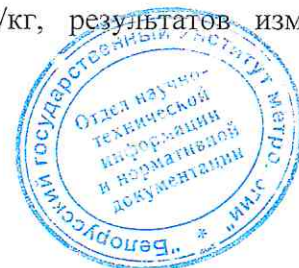
Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

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

Рассчитывают среднее арифметическое значение, мг/кг, результатов измерений соответственно

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}$$

(10)



Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$, полученными в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, значение, которого сравнивают с абсолютным значением критической разности (норматив контроля внутрилабораторной воспроизводимости) CD_{abs} . Если выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abs} \quad (11)$$

то оба конечных результата считаются приемлемыми и общее среднее значение, рассчитанное по формуле (10) может быть использовано в качестве заявляемого результата.

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

$$CD_{abs} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{X} \quad (12)$$

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

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

$$CD = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}} \quad (13)$$

где r – относительное значение предела повторяемости, %, приведенное в таблице 5;

R – относительное значение предела внутрилабораторной воспроизводимости, %, приведенное в таблице 4.

Таблица 4 – Относительные значения предела повторяемости, внутрилабораторной воспроизводимости и норматива контроля-правильности

Виды продукции	Предел повторяемости r , %	Предел внутрилабораторной воспроизводимости R , %	Норматив контроля правильности K_{omn} , %
Матрица I (кондитерские мучные изделия)	14,7	27,0	10,0
Матрица II (хлебо-булочные изделия)	10,3	23,3	10,0
Матрица III (мясорастительные консервы для детского питания)	15,7	25,1	10,0
Матрица IV (кукуруза, кукурузная мука, крупа из кукурузы)	22,3	23,1	10,0
Матрица V (рис, рисовая мука, крупа из риса)	9,3	28,6	10,0
Матрица VI (сухие смеси для детского питания, включая молокосодержащие)	14,7	32,4	10,0
Матрица VII (мука соевая)	6,9	31,1	10,0
Матрица VIII (сухое молоко)	9,7	25,1	10,0
Матрица IX (мясные продукты)	20,1	23,6	10,0

При невыполнении условия (11) проводят повторные измерения согласно разделу 10.



13.3 Контроль правильности результатов измерений

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

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

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

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

13.3.1 Образцы для контроля правильности

Данные образцы для контроля представляют собой навеску пробы, массовая концентрация глиаина в которых менее предела измерения данной МВИ, в которую внесена добавка раствора глиаина. Добавка вносится непосредственно в пробирки с навесками (аликвотами) проб. Значение массовой концентрации глиаина 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 раствора глиаина, нг/см³;
 V_{ST} – объем раствора глиаина, см³;
 m – масса навески пробы, г.

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

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

13.3.2 Проведение контрольной процедуры

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

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

$$\bar{X}_K = \frac{\sum X_i}{n} \quad (15)$$

где X_i – i -ый результат измерений образца для контроля, мг/кг;
 n – число измерений (рекомендуется не менее 6).

Проводят контроль условия повторяемости по п. 11.2, используют вместо относительного предела повторяемости r приведенного в таблице 5, значение $1,43 \cdot r$.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_K - X_{Gl}| \leq 0,01 \cdot K_{отн} \cdot \bar{X}_K \quad (16)$$

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

X_{Gl} – расчетное значение массовой концентрации глиаина в образце для контроля, мг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным



результатам, и принимают меры по их устранению.

13.4 Контроль стабильности результатов измерений

13.4.1 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта

С помощью данных карт контролируют (далее КК) следующие показатели точности:

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

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

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для их построения используют установленные показатели повторяемости при проведении валидации методики.

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

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

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

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

- Центральная линия

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r \quad (17)$$

где σ_r – относительное СКО повторяемости, %, экспериментально установленное при валидации методики измерений.

- Предупреждающие границы

$$UCL = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r \quad (18)$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r \quad (19)$$

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

Ведение карт предусматривает набор данных X_1, X_2 при выполнении испытаний образцов для контроля в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчет фактических относительных значений размаха W по формуле (19), оформление Листа данных контрольных карт и нанесение данных на эти карты.

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

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

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формуле



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

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

d_2 – коэффициент, $d_2=1,128$.

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

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

- Центральная линия

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

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 исследуемого вещества, по формуле

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

где X_i – массовая концентрация исследуемого вещества в пробе с добавкой, полученное для i -го измерения;

X_{exp} – рассчитанное значение массовой концентрации исследуемого вещества в пробе с добавкой.

- Предупреждающие границы

$$UCL = Rec + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = Rec - 2 \cdot S_{REC} \quad (24)$$

- Границы регулирования

$$UCL = Rec + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = Rec - 3 \cdot S_{REC} \quad (25)$$

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

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

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

Ведение карт предусматривает набор данных единичных измерений X , при выполнении испытаний образец для контроля в соответствии с МВИ, расчета фактических значений извлечения Rec_i по формуле (21), оформлении Листа данных контрольных карт и нанесения данных на эти карты.



14 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 8.010-99	Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.2.003-91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 1770-74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 22300-76	Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия.
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 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
ГОСТ 29245-91	Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей.
СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
СТБ ИСО 5725-2-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-3-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-4-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

15 Библиография

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

- [1] ISO 21748:2010 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and the trueness in measurement uncertainty estimation
- [2] Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК
Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях – 2-е издание, 2000, перевод с английского Р.Л. Кадиса, Г.Р. Нежиховского, В.Б. Сими́на под общей редакцией Л.А. Конопелько, Санкт-Петербург: ВНИИМ им. Д.И. Менделеева, 2002



УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по науке БелГИМ


Т.А. Коломиец
“ЛБ” 2018


ЭКСПЕРТНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам метрологической экспертизы
методики выполнения измерений (МВИ)

Наименование МВИ: Определение содержания глиаина в продуктах питания с использованием тест-системы «Ridascreen®Глиадин» производства R-Biopharm, Германия. Методика выполнения измерений

Разработчик: РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»

На метрологическую экспертизу представлены следующие документы:

- 1 Методика выполнения измерений (МВИ)
- 2 Отчет
- 3 Приложения А-И

По результатам метрологической экспертизы установлено:

- 1 Представленная методика предназначена для определения содержания глиаина в продуктах питания с использованием тест-системы «Ridascreen®Глиадин» производства R-Biopharm, Германия, и обладает следующими метрологическими характеристиками:

Виды продукции	Диапазон измерений, мг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение внутрिलाбораторной воспроизводимости, σ_R , %	Относительная стандартная суммарная неопределенность, u_c , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K=2$, $P=95$ %
Матрица I (кондитерские мучные изделия)	5,0-40,0	5,2	9,6	10,0	20,0
Матрица II (хлебо-булочные изделия)	5,0-40,0	3,7	8,3	10,0	20,0
Матрица III (мясорастительные консервы для детского питания)	5,0-40,0	5,6	9,0	10,0	20,0
Матрица IV (кукуруза, кукурузная мука, крупа из кукурузы)	5,0-40,0	8,0	8,2	11,0	22,0
Матрица V (рис, рисовая мука, крупа из риса)	5,0-40,0	3,3	10,2	11,0	22,0
Матрица VI (сухие смеси для детского питания, включая молочносодержащие)	5,0-40,0	5,2	11,6	12,0	24,0
Матрица VII (мука соевая)	5,0-40,0	2,5	11,1	12,0	24,0
Матрица VIII (сухое молоко)	5,0-40,0	3,5	9,0	9,0	18,0
Матрица IX (мясные продукты)	5,0-40,0	7,2	8,4	9,0	18,0

- 2 Методика соответствует требованиям ГОСТ 8.010-99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения».
- 3 Методика может быть использована для определения содержания глиаина в продуктах питания с использованием тест-системы «Ridascreen®Глиадин» производства R-Biopharm, Германия.

Начальник отдела испытаний
пищевой и сельскохозяйственной
продукции

Г.В. Артеменко

Начальник НИО ЗТМ, НТП

М.В. Шабанов



ДЗЯРЖАУНЫ КАМІТЭТ ПА СТАНДАРТЫЗАЦЫІ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства
"БЕЛАРУСКІ ДЗЯРЖАУНЫ
ІНСТЫТУТ МЕТРАЛОГІІ"
- БелДІМ -

Старавіленскі тракт 93, г. 220053, Мінск,
Тэлефон (017) 233 55 01 Факс (017) 288 09 38
Эл. пошта: info@belgim.by

Разліковы рахунак: 3012102776014, (RUR): 3012102776027
Рэгіянальная Дырэкцыя №700 ОАО «БПС-Сбербанк»,
БІК 153001369, праспект Машэрава, 80,
УНП 100055197, АҚПА 02568454



ОКПО 02568454
УНП 100055197
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Республиканское унитарное предприятие
"БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ИНСТИТУТ МЕТРОЛОГИИ"
- БелГИМ -

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

Расчётный счёт: 3012102776014, (RUR): 3012102776027
Региональная Дирекция №700 ОАО «БПС-Сбербанк»,
БИК 153001369, проспект Машерова, 80,
УНП 100055197, ОКПО 02568454

01.07. 2013. № 28-12, 7552
На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 782/2013 об аттестации МВИ

Определение содержания глиаина в продуктах питания с использованием тест-системы «Ridascreen ®Глиадин» производства R-Biopharm, Германия. Методика выполнения измерений

Методика выполнения измерений, разработанная РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию», и регламентированная в МВИ.МН 4658-2013 «Определение содержания глиаина в продуктах питания с использованием тест-системы «Ridascreen®Глиадин» производства R-Biopharm, Германия. Методика выполнения измерений» аттестована в соответствии с ГОСТ 8.010-99.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по разработке и экспериментальному исследованию МВИ.

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками при принятой доверительной вероятности $P=0,95$:

Виды продукции	Диапазон измерений, мг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение внутрилабораторной воспроизводимости, σ_R , %	Относительная стандартная суммарная неопределенность, u_c , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K=2, P=95$ %
Матрица I (кондитерские мучные изделия)	5,0-40,0	5,2	9,6	10,0	20,0
Матрица II (хлебо-булочные изделия)	5,0-40,0	3,7	8,3	10,0	20,0
Матрица III (мясорастительные консервы для детского питания)	5,0-40,0	5,6	9,0	10,0	20,0
Матрица IV (кукуруза, кукурузная мука, крупа из кукурузы)	5,0-40,0	8,0	8,2	11,0	22,0
Матрица V (рис, рисовая мука, крупа из риса)	5,0-40,0	3,3	10,2	11,0	22,0
Матрица VI (сухие смеси для детского питания, включая молочносодержащие)	5,0-40,0	5,2	11,6	12,0	24,0
Матрица VII (мука соевая)	5,0-40,0	2,5	11,1	12,0	24,0
Матрица VIII (сухое молоко)	5,0-40,0	3,5	9,0	9,0	18,0
Матрица IX (мясные продукты)	5,0-40,0	7,2	8,4	9,0	18,0

Заместитель директора по науке

Т.А. Коломиец