

Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии»
(БелГИМ)

СВИДЕТЕЛЬСТВО О МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ ПОДТВЕРЖДЕНИИ ПРИГОДНОСТИ
МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ (МВИ) № 998МШ/2016

Обозначение и наименование методики выполнения измерений:
МВИ.МШ 5730-2016 «Определение фумонизинов группы В в зерновых, зерно-
бобовых культурах и продуктах их переработки методом иммуноферментного
анализа с использованием набора реагентов «ИФА-ФУМОНИЗИН». Методика
выполнения измерений»

Заявитель: Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Разработчик: Институт биоорганической химии НАН Беларуси

Методика выполнения измерений соответствует требованиям, установленным в ГОСТ 8.010-99 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения».

Свидетельство о метрологическом подтверждении пригодности методики выполнения измерений выдано на основании экспертного заключения по результатам метрологической экспертизы от 28.12. 2016 г.

Заместитель директора по науке



Н.В. Баковец

ОДО "КОМПРОДСЕРВИС"
+375 (29) 6646019 +7 (499) 7040550
+375 (17) 3365054 info@komprod.com
ДЛЯ РАБОТЫ КАМЕРЫ И КОМПЬЮТЕРИЗАЦИИ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



ОКПО 02568454
УНН 100055197
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства
"БЕЛАРУСКИ ДЗЯРЖАЎНЫ
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 па г. Мінску
і Мінскай вобласці ОАО «БПС-Сбербанк»,
БІК 153001369, праспект Машэрава, 80,
УНП 100055197, АКПА 02568454

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 по г. Минску
и Минской области ОАО «БПС-Сбербанк»,
БИК 153001369, проспект Машерова, 80,
УНП 100055197, ОКПО 02568454

28.12. 2016 г. № 28-12/15032

На № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 998/2016 об аттестации МВИ

**Определение фумонизинов группы В в зерновых, зернобобовых культурах
и продуктах их переработки методом иммуноферментного анализа
с использованием набора реагентов «ИФА-ФУМОНИЗИН».**
Методика выполнения измерений

Методика выполнения измерений, разработанная Институтом биоорганической химии НАН Беларуси, и регламентированная в **МВИ.МН 5730-2016 «Определение фумонизинов группы В в зерновых, зернобобовых культурах и продуктах их переработки методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-ФУМОНИЗИН». 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 $P=0,95$:

Наименование	Диапазон измерений, мг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение прецизионности с изменяющимся фактором "время+оператор" $\sigma_{r(t)}$, %	Относительное значение предела повторяемости r , %	Относительное значение предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором "время+оператор" $r_{(t)}$, %	Относительная расширенная неопределенность измерения U , %
Фумонизины группы В	От 0,11 до 6,00 вкл.	5,7	9,3	16	26	23

Заместитель директора по науке



Н.В. Баковец

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке

БелГИМ

 Н.В. Баковец

«28»

12

2016 г.



УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора

Института биоорганической химии

НАН Беларуси



 С.В. Бабицкая

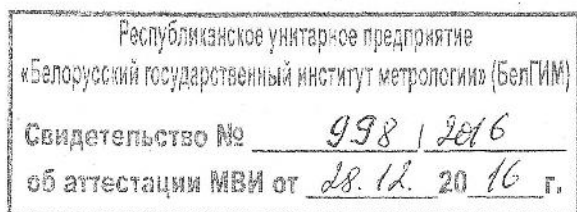
2016г.

Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь

Определение фумонизинов группы В в зерновых, зернобобовых культурах и продуктах их переработки методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-ФУМОНИЗИН»

Методика выполнения измерений

МВИ.МН 5730-2016



РАЗРАБОТЧИК

Институт биоорганической
химии НАН Беларуси

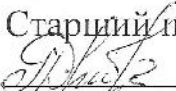
Заведующий лабораторией

 О.В. Свиридов

Ведущий научный сотрудник

 И.И. Вашкевич

Старший научный сотрудник

 Л.В. Дубовская

Научный сотрудник

 А.А. Ястребова

МИНСК, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

	Вводная часть	3
1	Нормативные ссылки	3
2	Метод измерений	5
3	Точность измерений	5
4	Средства измерений, оборудование и вспомогательные материалы	6
5	Требования безопасности и требования к квалификации Операторов	8
	5.1 Общие требования безопасности	8
	5.2 Требования безопасности при работе с метанолом	9
	5.3 Требования к квалификации операторов	9
6	Условия измерений	9
7	Условия хранения набора реагентов	10
8	Подготовка к выполнению измерений	10
	8.1 Приготовление растворов	10
	8.2 Отбор образцов и подготовка проб	11
	8.3 Приготовление раствора пробы	11
	8.4 Подготовка набора реагентов к выполнению измерений	12
	8.5 Подготовка микропланшетов	12
9	Выполнение измерений	13
10	Обработка результатов измерений	14
	10.1 Построение градуировочного графика	14
	10.2 Расчет массовой концентрации фумонизинов группы В	15
11	Оформление результатов измерений	16
12	Контроль точности результатов измерений	17
	12.1 Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости	17
	12.2 Контроль результатов, полученных в промежуточных условиях прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор»	17
	12.3 Контроль правильности	18
	12.4 Контроль стабильности результатов измерений с использованием контрольных карт Шухарта (ККШ)	20
	Библиография	23



Вводная часть

Настоящая методика выполнения измерений (далее – МВИ) предназначена для количественного определения фумонизинов группы В (V_1, V_2, V_3) в зерновых и зернобобовых культурах (пшеница, рожь, тритикале, ячмень, овес, просо, гречиха, рис, кукуруза, соя), продуктах их переработки (мука, крупы, отруби), а также кормах и кормовых добавках растительного происхождения (фуражное зерно, комбикорма, шроты, жмыхи) в целях ветеринарно-санитарной экспертизы и санитарно-гигиенического контроля методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа с применением набора реагентов «ИФА-ФУМОНИЗИН», производства Института биоорганической химии НАН Беларуси [1].

Определяемая массовая концентрация фумонизинов группы В является суммой массовых концентраций фумонизинов, находящихся в пробе, в пересчете на фумонизин V_1 с учетом перекрестной чувствительности, указанной в [1].

Диапазон измерений: от 0,11 до 6,00 мг/кг.

Предел измерений (LOQ) определяется значением величины нижней границы диапазона измерений.

Настоящая МВИ разработана в соответствии с ГОСТ 8.010.

1 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие технические нормативные правовые акты (далее – ТНПА):

СТБ ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1 Общие принципы и определения

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

СТБ 1499-2004 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 8.010-99 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения

ГОСТ 12.0.004-90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования



ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019-79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021-75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4780-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118 -77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995-77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 13496.0-80 Комбикорма, сырьё. Методы отбора проб

ГОСТ 13586.3-83 Зерно. Правила приемки и отбора проб

ГОСТ 13979.0-86 Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 27668-88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб

ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание – При пользовании МВИ целесообразно проверить действие ТНПА в области технического нормирования и стандартизации по каталогу, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененными (измененными) ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.



2 Метод измерений

2.1 Используемый метод основан на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далес-ИФА) с применением набора реагентов «ИФА-ФУМОНИЗИН».

В лунках планшетного иммуносорбента конъюгат фумонизина B_1 с ферментом – пероксидазой из корней хрена – конкурирует с фумонизином B_1 в составе градуировочных растворов или с фумонизинами группы В в составе экстрактов анализируемых проб за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами компоненты, к системе добавляют хромоген-субстратный раствор, который позволяет визуализировать реакции фумонизин B_1 -антитело. Связанный с антителами конъюгат фермента превращает хромоген в окрашенный продукт, при этом интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации фумонизина B_1 . Затем останавливают реакцию окрашивания добавлением стоп-реагента. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на микропланшетном фотометре как величину оптической плотности при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известным содержанием фумонизина B_1 строят градуировочную зависимость, с помощью которой определяют массовую концентрацию фумонизинов группы В в анализируемых образцах в пересчете на фумонизина B_1 .

3 Точность измерений

3.1 Настоящая МВИ обеспечивает получение результатов измерений массовой концентрации фумонизинов группы В с метрологическими характеристиками, приведенными в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Относительные значения показателя повторяемости σ_r , показателя промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$ с изменяющимся фактором «время+оператор» измерений массовой концентрации фумонизинов группы В в зерновых, зернобобовых культурах, продуктах их переработки при доверительной вероятности $P = 0,95$

Наименование	Диапазон измерений, мг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $\sigma_{I(TO)}$, %
Фумонизины группы В	от 0,11 до 6,00 включ.	5,7	9,3

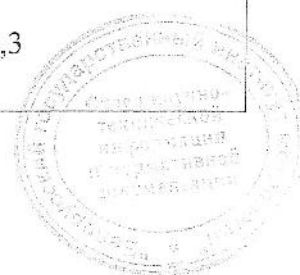


Таблица 2 – Относительные значения предела повторяемости r , предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(TO)}$ и относительной расширенной неопределенности U измерений массовой концентрации фумонизинов группы В в зерновых, зернобобовых культурах и продуктах их переработки при доверительной вероятности $P = 0,95$

Наименование	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное значение предела повторяемости r , %	Относительное значение предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» $r_{I(TO)}$, %	Относительная расширенная неопределенность измерения U , %
Фумонизины группы В	от 0,11 до 6,00 включ.	16	26	23

Смещение метода измерений массовой концентрации фумонизинов группы В незначимо.

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

показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-3;

показатели правильности – СТБ ИСО 5725-4;

оценка неопределенности – [2], [3].

4 Средства измерений, оборудование и вспомогательные материалы

4.1 При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, оборудование и материалы.

4.1.1 Автоматический микропланшетный фотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, с пределом допускаемой погрешности измерения оптической плотности не более 5 %.

4.1.2 Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и погрешностью взвешивания $\pm 0,1$ г по ГОСТ 24104.

4.1.3 Лабораторный встряхиватель, обеспечивающий частоту вращения до 300 об/мин.



4.1.4 Магнитная мешалка, частота вращения до 500 об/мин.

4.1.5 Мельница типа «Циклон» (Cyclotec Tecator, Швеция; ЛМТ-1, Россия и др.), снабженная металлическими ситами с отверстиями диаметром 1 мм, обеспечивающая 100 %-ный проход частиц через указанные сита.

4.1.6 Восьмиканальный дозатор с диапазоном объема дозирования от 5 до 300 мм³ с шагом 1,0 мм³ и погрешностью дозирования не более 3 % со сменными одноразовыми наконечниками.

4.1.7 Одноканальные дозаторы переменного объема с диапазоном дозирования объемов: от 20 до 200 мм³ с шагом 1,0 мм³ и погрешностью дозирования не более $\pm 1,5$ %, от 100 до 1000 мм³ с шагом 5,0 мм³ и погрешностью дозирования не более $\pm 1,5$ % со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

4.1.8 Сита лабораторные для мукомольной промышленности с номинальным размером круглого отверстия в свету или квадратного отверстия сетки 1 мм по [4].

4.1.9 Секундомер или таймер.

4.1.10 Термостат, обеспечивающий температуру от 20 до 25 °С.

4.1.11 Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от плюс 2 °С до плюс 8 °С с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше минус 18 °С, по СТБ 1499.

4.1.12 Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

4.1.13 Колбы конические Кн-1-100-29/32 ТС по ГОСТ 25336.

4.1.14 Стаканы В1-1-100, В1-1-250, В1-1-500 по ГОСТ 25336.

4.1.15 Пробирки П-2-10-14/23 по ГОСТ 1770.

4.1.16 Пипетки 1-1-1-5, 1-1-1-25 по ГОСТ 29277.

4.1.17 Фильтры обеззоленные «синяя лента» по [5].

4.1.18 Цилиндры 1-50-1, 1-100-1, 1-500-1 по ГОСТ 1770.

4.1.19 Бумага индикаторная универсальная по [6].

4.1.20 Стеклянные емкости с плотно закрывающимися крышками вместимостью 250 и 100 см³.

4.1.21 Пленка «парафильм» или скотч.

4.1.22 Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметр 100 мм, высота 15 мм или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

4.1.23 Штатив для пробирок.

4.1.24 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

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



4.1.27 Натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4328.

4.2 Набор реагентов «ИФА-ФУМОНИЗИН» [1] производства ИБОХ НАН Беларуси в стандартной комплектации:

- иммуносорбент, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, с иммобилизованным моноклональным антителом, 1 планшет;
- планшет для смешивания, 96-луночный полистирольный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, 1 планшет;
- градуировочный раствор C_0 с концентрацией 0 мг/кг, 0,9 см³;
- градуировочный раствор C_1 с условной величиной концентрации 0,11 мг/кг, 0,9 см³;
- градуировочный раствор C_2 с условной величиной концентрации 0,33 мг/кг, 0,9 см³;
- градуировочный раствор C_3 с условной величиной концентрации 1,00 мг/кг, 0,9 см³;
- градуировочный раствор C_4 с условной величиной концентрации 3,00 мг/кг, 0,9 см³;
- градуировочный раствор C_5 с условной величиной концентрации 6,00 мг/кг, 0,9 см³;
- конъюгат, готовый к работе раствор, 14,0 см³;
- раствор ТМБ, 0,7 см³;
- субстратный буферный раствор, 14 см³;
- стоп-реагент, 14,0 см³.

Примечание:

1 Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинных концентраций фумонизина B_1 в градуировочных растворах (мг/дм³) в массовые концентрации (мг/кг) микотоксина в образцах путем умножения на коэффициент 50, учитывающий массу экстрагируемого образца, объем экстракта и степень его разбавления при пробоподготовке. Это позволяет находить значение массовой концентрации фумонизинов группы В в исследуемом образце сразу по градуировочному графику.

2 В случае поставки хромоген-субстратного раствора в готовом к использованию виде, компонентом набора является хромоген-субстратный раствор, 14 см³.

Допускается использовать другие средства измерений и вспомогательное оборудование по метрологическим и техническим характеристикам, а материалы и реактивы (кроме набора реагентов), по качеству не уступающие указанным.

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реагентами и правила



При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реагентами и правила общей техники безопасности при работе в химической лаборатории согласно ГОСТ 12.1.007.

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования электробезопасности по ГОСТ 12.1.019.

Помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021, установкой пожарной сигнализации и пожаротушения по ГОСТ 12.4.009 и соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004

Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

Организация обучения работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.

5.2 Требования безопасности при работе с метанолом

Персонал, работающий с метанолом и его растворами, должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования инструкции по технике безопасности при работе с метанолом, утвержденной в установленном порядке.

Все работы с метанолом и его растворами должны проводиться строго в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты (фартуки, перчатки, очки). Запрещается работать с метанолом при выключенной приточно-вытяжной вентиляции и без применения средств индивидуальной защиты.

5.3 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или среднее специальное образование, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа и освоившие данную МВИ.

6 Условия измерений

6.1 При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия.

6.1.1 Температура воздуха от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

6.1.2 Относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре плюс 25 °С.



7 Условия хранения набора реагентов

7.1 Набор должен храниться в упаковке изготовителя при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание целого набора и отдельных компонентов не допускается.

7.2 Градуировочные растворы, конъюгат, а также субстратный буферный раствор, раствор ТМБ и стоп-реагент после вскрытия флаконов и последующей укупорки можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности набора.

7.3 Неиспользованные стрипы иммуносорбента следует хранить упакованными в плотно закрытом фольгированном пакете.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Приготовление растворов

8.1.1 Приготовление 20 %-го раствора натрия гидроокиси

Взвешивают $(10,00 \pm 0,1)$ г натрия гидроокиси в стакане вместимостью 100 см³ и растворяют в 40 см³ дистиллированной воды. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в полиэтиленовую емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С – 1 мес.

8.1.2 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=70:30

В стакан вместимостью 500 см³ цилиндром приливают 350 см³ метанола и 150 см³ дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С – 3 мес.

8.1.3 Приготовление хромоген-субстратного раствора.

Хромоген-субстратный раствор готовят в темных стеклянных или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор ТМБ разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1+20) из расчета 100 мм³ на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 см³ вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют соответствующее количество раствора ТМБ и интенсивно перемешивают в течение от 30 до 40 с.

Примечание: субстратный буферный раствор и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.



Приготовленный или поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

8.2 Отбор образцов и подготовка проб

8.2.1 Отбор образцов проводят по ГОСТ 13586.3, ГОСТ 27668, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13979.0.

Образцы хранят в бумажных или полотняных пакетах при температуре от плюс 2 °С до плюс 25 °С и влажности не более 80 % - 3 недели или в замороженном виде при температуре минус 18 °С - 6 мес в условиях, исключающих изменение их влажности.

8.2.2 Исследуемый образец размалывают на мельнице типа «Циклон». При отсутствии мельницы такого типа образец размалывают на лабораторной мельнице МЛЗ или мельнице других аналогичных марок, не снабженных ситами. Затем просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм. Остаток образца на сите снова измельчают на мельнице марки МЛЗ так, чтобы он весь прошел через сито с отверстиями диаметром 1 мм, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

8.3 Приготовление раствора пробы

8.3.1 При анализе каждой пробы выполняют два параллельных определения. Готовят по две навески ($5,0 \pm 0,1$) г размолотого образца в соответствии с п.8.2.2. Каждую навеску исследуемой пробы помещают в коническую колбу вместимостью 100 см³ и пипеткой добавляют 25 см³ раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода = 70:30.

8.3.2 Коническую колбу закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на встряхивателе в течение 7 мин. Затем дают отстояться раствору в течение 10 мин и фильтруют в пробирку через фильтр «синяя лента». Контроль pH фильтрата проводят по универсальной индикаторной бумаге, доводя до значения 6-8, используя концентрированную соляную кислоту или 20 %-ный раствор гидроокиси натрия.

8.3.3 В пробирку отбирают дозатором 0,1 см³ фильтрата и добавляют 0,9 см³ дистиллированной воды. Раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение двух часов.



8.3.4 При выполнении измерений проб с концентрацией фумонизинов группы В превышающей верхний предел измерений данной методики, выполняют разбавление пробы, подготовленной по п. 8.3.3 дистиллированной водой.

Степень разбавления зависит от ожидаемого содержания фумонизинов группы В. Для этого в отдельной пробирке к одной части подготовленной аликвоты пробы (п.8.3.3) добавляют, в зависимости от необходимого разбавления, одну (1:1), две (1:2), три (1:3), четыре (1:4), пять (1:5) или более частей дистиллированной воды. При этом фактор разбавления F равен 2, 3, 4, 5, 6 или более, соответственно.

Пробы перемешивают и используют для проведения ИФА в течение 2 часов.

8.4 Подготовка набора реагентов к выполнению измерений

Перед проведением измерений набор реагентов извлекают из холодильника и выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение от 0,5 до 1 ч.

Перед использованием все растворы из набора легко встряхивают в течение 10 с, избегая разбрызгивания и образования пены.

8.5 Подготовка микропланшетов

Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов исследуемых проб в микропланшетах согласно рисунку 1 с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и раствора пробы требуется две лунки.

Лунка в стрипе	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₀	C ₀	П ₃	П ₃								
B	C ₁	C ₁	П ₄	П ₄								
C	C ₂	C ₂	П ₅	П ₅								
D	C ₃	C ₃	П ₆	П ₆								
E	C ₄	C ₄	П ₇	П ₇								
F	C ₅	C ₅	П ₈	П ₈								
G	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉								
H	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀								

C₀ – C₅ – градуировочные растворы в лунках A1-F1 стрипа №1 и A2-F2 стрипа №2.

П₁ – П₁₁ – растворы проб в лунках G-H стрипов №1 и №2 и в лунках A-H стрипов №3 и №4.

Рисунок 1 – Схема расположения лунок



В одной постановке используют не более четырех стрипов.

В рамку микропланшета разборного - иммуносорбента устанавливают необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами.

В рамку микропланшета для смешивания устанавливают соответствующее количество стрипов.

Неиспользованные стрипы иммуносорбента возвращают в фольгированный пакет, заклеивают липкой лентой и помещают в холодильник.

9 Выполнение измерений

9.1 В чашку Петри или пластмассовую кювету вносят раствор конъюгата в объеме 1 см^3 на стрип.

С помощью восьмиканального или одноканального дозатора в лунки планшета для смешивания вносят по 100 мм^3 конъюгата. Затем в соответствующие лунки планшета для смешивания, размеченного согласно п. 8.5, одноканальным дозатором вносят по 100 мм^3 каждого градуировочного раствора и аликвоты объемом 100 мм^3 двух параллельных растворов проб каждого исследуемого образца.

9.2 Растворы в лунках перемешивают восьмиканальным дозатором, три раза пипетируя раствор вверх и вниз, не допуская образования пены. Для каждого стрипа используют чистые наконечники.

Немедленно после перемешивания из лунок планшета для смешивания отбирают восьмиканальным дозатором по 100 мм^3 полученной смеси и переносят в соответствующие лунки иммуносорбента - микропланшета разборного с иммобилизованными антителами.

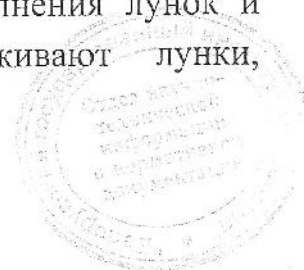
Примечание - временной интервал от начала перемешивания до начала инкубации не более 3 мин.

9.3 Закрывают планшет пленкой или скотчем, крышкой и инкубируют в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C .

9.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета.

В пластмассовую кювету вносят необходимый объем деионизованной или дистиллированной воды из расчета 200 мм^3 на одну промывку при четырехкратном промывании каждой лунки.

При промывании планшета: контролируют заполнение всех лунок и полное удаление промывной воды; не допускают переполнения лунок и перетекания промывной воды между ними; выдерживают лунки, заполненные промывной водой, не менее 10 с.



Остатки промывной воды удаляют, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

9.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету вносят хромоген-субстратный раствор в объеме из расчета 1 см^3 на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мм^3 хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают планшет пленкой или скотчем, крышкой и инкубируют в течение 10 мин в термостате или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C .

9.6 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят стоп-реагент в объеме из расчета 1 см^3 на стрип.

По истечении времени инкубации в каждую лунку планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мм^3 стоп-реагента.

Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 В течение не более 15 мин после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке на микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм .

10 Обработка результатов измерений

10.1 Построение градуировочного графика

Обработка результатов измерений проводится с применением прилагаемого шаблона в формате Microsoft Excel (диск с шаблоном для обьчета получаемых данных поставляется изготовителем потребителю).

В соответствующие графы шаблона вносят полученные в условиях повторяемости результаты измерения оптической плотности градуировочных растворов $C_0 - C_5$ и растворов исследуемых проб.

Программа Excel с применением прилагаемого шаблона автоматически рассчитывает процент связывания для градуировочных растворов $C_1 - C_5$ и для раствора исследуемой пробы относительно градуировочного раствора C_0 с концентрацией фумонизина $B_1 - 0,0 \text{ мг/кг}$:

$$\frac{B_i}{B_0} \cdot 100\%, \frac{B_p}{B_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

где B_0 – средняя оптическая плотность градуировочного раствора C_0 ;

B_i – средняя оптическая плотность i -го градуировочного раствора ($i = 1, 2, 3, 4$ и 5);

B_p – оптическая плотность раствора пробы.



Программа Excel с применением прилагаемого шаблона автоматически на основании введенных оператором в таблицу раздела 1 прилагаемого шаблона параллельных измерений оптической плотности для каждого градуировочного раствора строит градуировочный график и рассчитывает параметры градуировочного графика.

Градуировочная зависимость должна иметь вид

$$Y = a + b \cdot X \quad (2)$$

где

$$Y = \log it \left(\frac{B_i}{B_0} \right) = \lg \left(\frac{B_i/B_0}{1 - B_i/B_0} \right) \quad (3)$$

$$X = \lg C_i \quad (4)$$

где C_i – массовая концентрация фумонизина B_i в i -ом градуировочном растворе, мг/кг.

Коэффициенты a и b вычисляются по формулам:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^4 y_i - b \sum_{i=1}^4 x_i}{4} \quad (5)$$

$$b = \frac{4 \sum_{i=1}^4 x_i y_i - \sum_{i=1}^4 x_i \sum_{i=1}^4 y_i}{4 \sum_{i=1}^4 x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^4 x_i \right)^2} \quad (6)$$

10.2 Расчет массовой доли фумонизинов группы В

Программа Excel с применением прилагаемого шаблона автоматически рассчитывает массовую долю фумонизинов группы В в пробе, C , мг/кг :

$$C = 10^{X_p} \quad (7)$$

где

X_p – логарифм массовой доли фумонизинов группы В в пробе, найденный по формуле

$$X_p = \frac{Y_p - a}{b} \quad (8)$$

$$\text{где } Y_p = \lg \left(\frac{B_p/B_0}{1 - B_p/B_0} \right) \quad (9)$$

В случае дополнительного разбавления пробы по п. 8.3.4, полученный результат C умножают на фактор разбавления F .



За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений, выполненных в условиях повторяемости:

$$\bar{C} = \frac{C_1 + C_2}{2} \quad (10)$$

где $\bar{C}$ – среднее арифметическое значение результатов двух измерений, мг/кг;

C_1 и C_2 – значения результатов двух измерений, мг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до второго десятичного знака.

$\bar{C}$ принимают за окончательный результат, если выполняется неравенство:

$$|C_1 - C_2| \leq 0,01 \cdot \bar{C} \cdot r \quad (11)$$

где r – относительное значение предела повторяемости согласно таблице 2, %.

Если соотношение (11) не выполняется, испытания пробы необходимо повторить.

11 Оформление результатов измерения

Полный результат измерений C представляют в виде

$$\bar{C} \pm U_{абс}, \text{ мг/кг} \quad (12)$$

Численное значение расширенной неопределенности $U_{абс}$, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$U_{абс} = 0,01 \cdot \bar{C} \cdot U \quad (13)$$

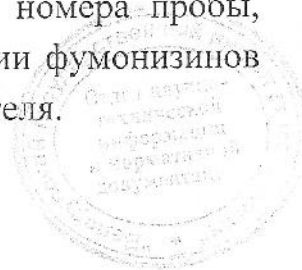
где U – относительная расширенная неопределенность, %, согласно таблице 2.

Если окончательный результат измерений оказывается меньше значения нижней границы соответствующего диапазона измерений, то вычисление массовой концентрации фумонизинов группы В не проводится, а дается односторонняя оценка массовой концентрации фумонизинов группы В, в мг/кг, в виде

$$C < C_{LoQ} \quad (14)$$

где C_{LoQ} – значение нижней границы соответствующего диапазона измерений согласно таблице 1.

Полный результат измерений регистрируют в рабочем журнале с указанием даты проведения анализа, идентификационного номера пробы, наименования и значения измеряемой массовой концентрации фумонизинов группы В, точности измерений, фамилии и подписи исполнителя.



12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль результатов проводят в соответствии с СТБ ИСО 5725-6.

Расхождение между параллельными результатами измерений одного образца, полученное в условиях повторяемости при доверительной вероятности $P = 0,95$, должно удовлетворять условию

$$|C_1 - C_2| \leq 0,01 \cdot \bar{C} \cdot r \quad (15)$$

где C_1 и C_2 – значения результатов двух параллельных измерений, мг/кг;

$\bar{C}$ – среднее арифметическое значение результатов двух измерений, мг/кг;

r – относительное значение предела повторяемости согласно таблице 2, %.

Если условие (15) не выполняется, то измерения необходимо повторить.

12.2 Контроль результатов, полученных в промежуточных условиях прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор»

Контроль проводят в соответствии с СТБ ИСО 5725-6.

Критическая разность CD для измерений, полученных лабораторией в промежуточных условиях прецизионности при соблюдении условий повторяемости при доверительной вероятности $P=0,95$ рассчитывается по формуле

$$CD = \sqrt{r^2_{I(TO)} - \frac{r^2}{2}} \quad (16)$$

Расхождение между результатами измерений, полученное в промежуточных условиях прецизионности при доверительной вероятности $P = 0,95$ должно удовлетворять условию

$$|\bar{C}_1 - \bar{C}_2| \leq 0,01 \cdot \bar{\bar{C}} \cdot CD \quad (17)$$

где $\bar{C}_1$ и $\bar{C}_2$ – средние значения результатов параллельного измерения одного образца, полученные в промежуточных условиях прецизионности, мг/кг;

$\bar{\bar{C}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений, полученных в промежуточных условиях прецизионности, мг/кг;

$r_{I(TO)}$ – относительное значение предела промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» согласно таблице 2, %.



Если условие (17) не выполняется, то один результат или оба являются неверными и измерения необходимо повторить

12.3 Контроль правильности

Контроль правильности проводят в соответствии с СТБ ИСО 5725-6.

12.3.1 Количественная оценка применения лабораторией данного метода измерений проводится внутри лаборатории на основании оценки лабораторного смещения посредством сравнения результатов измерений с принятым эталонным значением образца сравнения, массовая концентрация которого должна находить в диапазоне измерений МВИ. При этом следует учитывать, что массовая концентрация фумонизинов группы В, определяемая данной МВИ, будет зависеть от суммарной массовой концентрации фумонизинов B_1 , B_2 и B_3 с учетом перекрестной чувствительности на индивидуальные соединения. В качестве образца сравнения может быть использован референтный материал, естественно контаминированный микотоксинами, с сертифицированным значением (например, образцы Trilogy® Analytical laboratory, США) или образец, в котором массовая концентрация фумонизинов группы В установлена на основании межлабораторного сличительного эксперимента.

Смещение в лаборатории при выполнении двух параллельных измерений должно удовлетворять условию

$$|X - \mu| < 2\sqrt{\sigma_{I(TO)(abc)}^2 - \frac{\sigma_r^2(abc)}{2}} \quad (18)$$

где

$$\sigma_{I(TO)(abc)} = \frac{\sigma_{I(TO)} \cdot X}{100} \quad (19)$$

$$\sigma_r(abc) = \frac{\sigma_r \cdot X}{100} \quad (20)$$

X – результат измерения, полученный в оцениваемой лаборатории, мг/кг;

μ – сертифицированное значение образца сравнения, мг/кг;

σ_r , $\sigma_{I(TO)}$ – относительные значения показателей повторяемости и показателя промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» согласно таблице 1.

Если неравенство (18) не выполняется, то измерения необходимо повторить. При невыполнении неравенства необходимо выяснить и устранить причины невыполнения неравенства (18) и повторить измерения.

12.3.2 В случае отсутствия эталонного образца сравнения оценка смещения может производиться путем анализа образцов для контроля (ОК) с

заранее известным значением концентрации фумонизина B_1 (рабочая проба с добавкой).

Неопределенность значения массовой концентрации фумонизина B_1 в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

Контроль правильности проводится с использованием добавок фумонизина B_1 . Величина массовой концентрации фумонизина B_1 в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений. Для внесения добавки используется раствор, приготовленный из фумонизина B_1 в соответствии с рекомендациями производителя. Допускается использовать готовые растворы для добавки (spike-растворы) фумонизина B_1 , при условии, что относительная стандартная неопределенность концентрации фумонизина B_1 в них не превышает 3 %.

Исследуемую пробу делят на две части. Одну часть пробы анализируют без добавки фумонизина B_1 . Получают результат измерения массовой концентрации фумонизина $B_1 - C_0$ в полном соответствии с МВИ. Из второй части пробы отбирают шесть навесок. В каждую навеску вносят добавку фумонизина $B_1 - X_{REF}$, которая рассчитывается по формуле (21).

$$X_{REF} = \frac{C_m \cdot V_m}{m_{np}} \quad (21)$$

где C_m – концентрация добавленного раствора фумонизина B_1 , мкг/см³;

V_m – объем добавленного раствора фумонизина B_1 , см³;

m_{np} – масса пробы с добавленным раствором фумонизина B_1 , г.

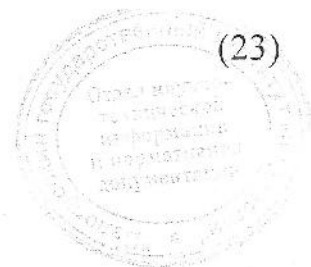
В условиях повторяемости получают шесть результатов измерения содержания фумонизинов группы В в пробе с добавкой C_i .

Рассчитывают значение R_{mi} для каждого результата измерения по формуле

$$R_{mi} = \frac{C_i - C_0}{X_{REF}} \quad (22)$$

Находят среднее значение $\bar{R}_m$

$$\bar{R}_m = \frac{1}{6} \sum_{i=1}^6 R_{mi} \quad (23)$$



Если значение $\bar{R}_m$ удовлетворяет условию (24), то результат контроля правильности считается удовлетворительным.

$$0,85 \leq \bar{R}_m \leq 1,15 \quad (24)$$

Если условие (24) не выполняется, то измерения необходимо повторить. При невыполнении условия проводят анализ и устранение причин невыполнения неравенства (24).

12.4 Контроль стабильности результатов измерений с использованием контрольных карт Шухарта (ККШ).

Контроль стабильности результатов измерений массовой концентрации фумонизинов группы В осуществляется по показателям повторяемости σ_r и промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$ с использованием контрольных карт Шухарта в соответствии с СТБ ИСО 5725-6.

Применение ККШ основано на сопоставлении результатов контрольных процедур с установленными нормативами контроля: пределами регулирования, устанавливаемыми при доверительной вероятности $P = 0,997$, и пределами предупреждения, устанавливаемыми при доверительной вероятности $P = 0,95$.

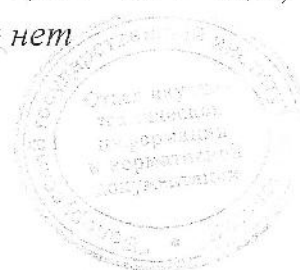
Число контрольных процедур в течение временного диапазона устанавливается в документах системы менеджмента качества лаборатории.

ККШ для каждого из контролируемых показателей качества результатов анализа строят по результатам измерений содержания фумонизинов группы В в исследуемых образцах по рассчитанным величинам размахов по формулам (25), (26). В работе участвует два аналитика.

Всего строится две ККШ – одна для контроля стабильности результатов измерений содержания фумонизинов группы В по показателям повторяемости σ_r , другая для контроля стабильности результатов измерений содержания фумонизинов группы В по показателю промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$. Алгоритм построения ККШ для двух контрольных измерений следующий:

1) На контрольных картах повторяемости и промежуточной прецизионности наносят следующие горизонтальные линии:

центральные линии	$CL_r = 1,128 \cdot 0,01 \cdot \sigma_r$	$CL_{I(TO)} = 1,128 \cdot 0,01 \cdot \sigma_{I(TO)}$
границы предупреждения	$UCL_r = 2,834 \cdot 0,01 \cdot \sigma_r$ $LCL_r = \text{нет}$	$UCL_{I(TO)} = 2,834 \cdot 0,01 \cdot \sigma_{I(TO)}$ $LCL_{I(TO)} = \text{нет}$
границы регулирования	$UCL_r = 3,686 \cdot 0,01 \cdot \sigma_r$ $LCL_r = \text{нет}$	$UCL_{I(TO)} = 3,686 \cdot 0,01 \cdot \sigma_{I(TO)}$ $LCL_{I(TO)} = \text{нет}$



где σ_r и $\sigma_{I(TO)}$ - относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности с изменяющимся фактором «время+оператор» согласно таблице 1, %;

1,128; 2,834; 3,686 – коэффициенты для расчета центральной, предупреждающей, регулирующей границ ККШ (таблица 4 СТБ ИСО 5725-6);

2) Получают результаты контрольных измерений и рассчитывают результаты контрольных процедур относительных размахов:

В условиях повторяемости по формуле

$$r_k = \frac{C_1 - C_2}{\bar{C}} \quad (25)$$

где C_1 и C_2 - результаты измерений массовой концентрации фумонизинов группы В, полученные в условиях повторяемости, мг/кг;

$\bar{C}$ – среднее значение двух результатов, полученных в условиях повторяемости, мг/кг.

В условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами «время+оператор» по формуле

$$r_{kI(TO)} = \frac{C_1 - C_2}{\bar{C}} \quad (26)$$

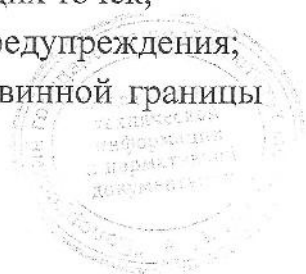
где C_1 и C_2 – значения результатов измерения, полученные в промежуточных условиях прецизионности, мг/кг;

$\bar{C}$ – среднее значение двух результатов измерений содержания фумонизинов группы В в промежуточных условиях прецизионности, мг/кг.

3) Результаты контрольных процедур (r_k , $r_{kI(TO)}$) наносят на ККШ, предназначенные для контроля повторяемости и промежуточной прецизионности. При заполнении ККШ по горизонтальной оси откладывают номер контрольной процедуры, по вертикальной оси – результаты контрольной процедуры.

При интерпретации ККШ сигналом к возможному нарушению стабильности процесса анализа может служить появление на ККШ следующих ситуаций:

- одна точка вышла за границу регулирования;
- девять точек подряд находятся в зоне выше половинной границы зоны предупреждения или по одну сторону от центральной линии;
- шесть возрастающих или убывающих точек подряд;
- четырнадцать попеременно убывающих и возрастающих точек;
- две из трех последовательных точек выше границы предупреждения;
- четыре из пяти последовательных точек выше половинной границы зоны предупреждения;



- пятнадцать последовательных точек в зоне регулирования выше или ниже центральной линии;

- восемь последовательных точек по обеим сторонам центральной линии и ни одной в зоне регулирования.

При появлении одной из вышеперечисленных ситуаций проводят анализ и устранение причин возникшей ситуации.



Библиография

[1] ТУ ВУ 100185129.152-2015 Набор реагентов для определения фумонизинов группы В в кормах для животных, пищевой продукции и продовольственном сырье методом иммуноферментного анализа «ИФА-ФУМОНИЗИН»

[2] «Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК по количественному описанию неопределенности в аналитических измерениях»

[3] VAM Project 3.2.1 Development and Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data»

[4] ТУ 5149-001-56476476-02 Сита лабораторные контрольные металлотканые У1-ЕСЛ-К. Номенклатура

[5] ТУ 2642-001-13927158-2003 Фильтры обеззоленные «Синяя лента», «Белая лента», «Красная лента»

[6] ТУ 6-09-1181-89 Бумага индикаторная универсальная для определения pH 1-10 и 7-14. Технические условия

