
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
52471—
2005

КОРМА

Иммуноферментный метод определения микотоксинов

Издание официальное

БЗ 12—2005/319



Москва
Стандартинформ
2006

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии» Россельхозакадемии

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 декабря 2005 г. № 489-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет

Содержание

| | |
|--|----|
| 1 Область применения. | 1 |
| 2 Нормативные ссылки | 1 |
| 3 Термины, определения, обозначения и сокращения | 2 |
| 4 Сущность иммуноферментного метода определения | 2 |
| 5 Прецизионность метода. | 3 |
| 6 Требования к условиям выполнения измерений. | 4 |
| 7 Средства измерений и вспомогательное оборудование. | 4 |
| 8 Реактивы, материалы, посуда | 4 |
| 9 Подготовка к выполнению определения. | 5 |
| 10 Определение микотоксинов | 7 |
| 11 Обработка результатов измерений | 9 |
| 12 Контроль точности результатов измерения | 9 |
| 13 Требования безопасности. | 9 |
| Приложение А (обязательное) Сведения по комплектации тест-систем | 10 |
| Приложение Б (рекомендуемое) Форма для записи результатов | 10 |
| Приложение В (рекомендуемое) Таблица для записи результатов анализа. | 11 |
| Библиография. | 11 |

КОРМА

Иммуноферментный метод определения микотоксинов

Feedstuffs.

Immunoenzyme method of mycotoxin determination

Дата введения — 2007—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает иммуноферментный метод определения содержания микотоксинов (афлатоксин В₁, роридин А, охратоксин А, стеригматоцистин, Т-2 токсин, зеараленон, фумонизин В₁) в кормах.

Настоящий стандарт распространяется на зерновые корма, зернобобовые кормовые культуры, искусственно высушенные и грубые корма, продукцию комбикормовой промышленности (комбикорма полнорационные, комбикорма-концентраты), сырье для производства кормов и кормовые добавки, за исключением кормовых добавок минерального происхождения и продукции органического синтеза.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 8.563—96 Методики выполнения измерений

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие требования

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

ГОСТ Р ИСО 5725-3—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений

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

ГОСТ Р 51088—97 Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Общие технические условия

ГОСТ 8.315—97 Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения

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

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 334—73 Бумага масштабно-координатная. Технические условия
ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия
ГОСТ 6709—72 Реактивы. Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб
ГОСТ 13586.3—83 Зерно. Правила приемки и методы 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 27262—87 Корма растительного происхождения. Методы отбора проб
ГОСТ 27668—88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб.

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения, обозначения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 8.563, ГОСТ Р ИСО 5725-1, ГОСТ Р 51088, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **тест-система:** Набор (комплект) специально подобранных реагентов (реактивов) и составных частей, предназначенный для определения одного или нескольких конкретных веществ.

3.1.2 **основной раствор:** Раствор реактива, приготавливаемый заблаговременно и необходимый для приготовления других типов растворов.

3.1.3 **вспомогательный раствор:** Раствор, приготавливаемый заблаговременно из основного раствора и необходимый для приготовления других типов растворов.

3.1.4 **рабочий раствор:** Раствор одного или нескольких реактивов, приготавливаемый непосредственно перед использованием и необходимый для выполнения процедуры анализа.

3.2 В настоящем стандарте применяют следующие сокращения:

- ИФА — иммуноферментный анализ;
ОП — оптическая плотность;
АГ — антиген;
АТ — антитела;
АНС — 8-анилин-1-нафталинсульфо кислота;
ФДА — о-фенилендиамин.

4 Сущность иммуноферментного метода определения

Имуноферментный метод основан на измерении содержания микотоксинов в пробах с помощью непрямого твердофазного конкурентного ИФА рабочих растворов экстрактов (рисунок 1).

Непрямой ИФА основан на способности микотоксинов взаимодействовать со специфическими антителами (АТ) в условиях конкуренции с белковым конъюгатом микотоксина, нанесенным на поверхность ячеек планшета, — твердофазным антигеном (АГ).

Аналитический сигнал (регистрируемое значение оптической плотности), измеряющий степень взаимодействия АТ с АГ, обратно пропорционален массовой концентрации микотоксина в рабочем растворе.



Рисунок 1 — Основные этапы иммуноферментного метода определения

5 Прецизионность метода

Показатели прецизионности метода определены в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-2, ГОСТ Р ИСО 5725-3 и представлены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 — Показатели прецизионности метода иммуноферментного определения микотоксинов

| Определяемый компонент | Содержание, мг/кг | Относительное стандартное отклонение повторяемости $S_{r, \text{отн}}$, % | Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $S_{R, \text{ИТОЕ, отн}}$, % | Предел повторяемости $r_{\text{отн}}$, % | Предел промежуточной прецизионности $R_{R, \text{ИТОЕ, отн}}$, % |
|---|----------------------|--|--|---|--|
| Афлатоксин В ₁ | 0,002—0,050 | 15 | 18 | 42 | 50 |
| Роридин А Охратоксин А Стеригматоцистин | 0,004—0,100 | 13 | 16 | 36 | 45 |
| Т-2 токсин Зевараленон | 0,020—0,500 | 12 | 14 | 34 | 39 |
| Фумонизин В ₁ | 0,050—5,000 | 12 | 14 | 34 | 39 |

Расхождение между результатами двух параллельных определений, полученных в условиях повторяемости, может превышать предел повторяемости r не более одного раза из двадцати.

Расхождение двух результатов анализа, полученных в условиях промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности (разное время, разные операторы, разное оборудование), может превышать значение предела промежуточной прецизионности $R_{\text{ИТОЕ}}$ не более одного раза из двадцати.

6 Требования к условиям выполнения измерений

Измерения проводят в лабораторных условиях при температуре окружающего воздуха (23 ± 5) °С, атмосферном давлении (97 ± 10) кПа, относительной влажности (65 ± 15) %, частоте переменного тока (50 ± 5) Гц, напряжении в сети (220 ± 10) В.

7 Средства измерений и вспомогательное оборудование

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений и вспомогательное оборудование:

фотометр вертикального типа фотометрирования с диапазоном измерения оптической плотности 0—2,5 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного измерения не более $\pm 0,005$ в комплекте с интерференционным светофильтром для длин волн 490—492 нм [1];

весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более $\pm 0,0002$ г;

цилиндры по ГОСТ 1770 исполнения 1 вместимостью 25, 100, 1000 см³;

колбы по ГОСТ 1770 исполнения 2 вместимостью 100 см³;

дозаторы пипеточные для объемов доз 0,005—0,05; 0,02—0,2; 1—5 см³ [2] в комплектах со сменными одноразовыми наконечниками;

микрошприц МШ-10 вместимостью 0,01 см³ [3];

микрошприцы вместимостью 0,1 см³ (кат. № Z 10,895-2) и 0,5 см³ (кат. № Z 10,897-9), фирма «Алдрич»;

шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий постоянство температуры (130 ± 5) °С [4];

шкаф холодильный любого типа, обеспечивающий среднюю температуру в холодильной камере не выше 10 °С [5];

дистиллятор любого типа [6];

калькулятор любого типа с логарифмической функцией.

Допускается использование другого оборудования и средств измерений, позволяющих воспроизводить метрологические характеристики, указанные в данном стандарте. Могут быть использованы ГСО состава растворов микотоксинов (ГОСТ 8.315) с аттестованными значениями массовых концентраций и предназначенные для выполнения ИФА.

8 Реактивы, материалы, посуда

При выполнении измерений применяют следующие реактивы и материалы:

кислоту серную концентрированную по ГОСТ 4204;

натрий сернистокислый по нормативному документу;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

ацетонитрил, ч.д.а [7];

препараты микотоксинов, фирма «Сигма»:

афлатоксина В₁ (кат. № А 6636),

роридина А (кат. № R 7502),

охратоксина А (кат. № О 1877),

стеригматоцистина (кат. № S 3255),

Т-2 токсина (кат. № Т 4887),

зеараленона (кат. № Z 2125),

фумонизина В₁ (кат. № А 1147);

тест-системы для непрямого твердофазного конкурентного ИФА в комплектации с реактивами АТ, АГ, ФК, БУФЕР-ОТ, БУФЕР-Р1, БУФЕР-Р2, СУБСТРАТ, ФДА (приложение А), предназначенные для определения микотоксинов:

афлатоксина В₁ в диапазоне концентраций 0,00004—0,001 мкг/см³ [8],

роридина А в диапазоне концентраций 0,00004—0,001 мкг/см³ [9],

охратоксина А в диапазоне концентраций 0,00008—0,002 мкг/см³ [10],

стеригматоцистина в диапазоне концентраций 0,00008—0,002 мкг/см³ [11],

Т-2 токсина в диапазоне концентраций 0,0004—0,01 мкг/см³ [12],

зеараленона в диапазоне концентраций 0,0004—0,01 мкг/см³ [13].

фумонизина В₁ в диапазоне концентраций 0,001—0,1 мкг/см³ [14];
 планшет 96-ячеечный полистироловый наборный [15];
 пробирки по ГОСТ 1770 исполнения 1 вместимостью 10 см³;
 колбы по ГОСТ 25336 типа Кн вместимостью 100, 500, 1000 см³;
 воронки по ГОСТ 25336 В-56-80 ХС;
 флаконы вместимостью 2 см³, фирма «Сигма» (кат. № Z 11, 508-8);
 бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
 бумагу масштабнo-координатную по ГОСТ 334 марки Н-1.

Допускается использовать другие реактивы и материалы по качеству не хуже указанных в данном стандарте.

9 Подготовка к выполнению определения

9.1 Подготовка проб

Отбор проб и их подготовка к определению — по методам, указанным в нормативных документах на конкретную продукцию: комбикорма — по ГОСТ 13496.0, зерно — по ГОСТ 13586.3, жмыхи и шроты — по ГОСТ 13979.0, мука и отруби — по ГОСТ 27668, искусственно высушенные и грубые корма — по ГОСТ 27262. Средние пробы следует измельчать до порошкообразного состояния, размол средних проб рассыпных и гранулированных кормов проводить по ГОСТ 13979.0.

При проведении аналитических измерений одновременно используют две параллельные пробы.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

Лабораторную стеклянную посуду следует мыть хромовой смесью, многократно промывать водопроводной водой и один раз ополаскивать дистиллированной водой. Высушивать посуду необходимо в сушильном шкафу.

9.3 Подготовка прибора к работе

Подготовку и проверку фотометра проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническим описанием к прибору.

9.4 Приготовление основных и вспомогательных растворов

9.4.1 Приготовление раствора для остановки ферментативной реакции

Навеску 1,26 г безводного сернистоокислого натрия помещают в колбу вместимостью 500 см³. Цилиндром вместимостью 100 см³ отмеряют 80,0 см³ воды, вливают в колбу и перемешивают до полного растворения. Цилиндром вместимостью 25 см³ отмеряют 20,0 см³ концентрированной серной кислоты, осторожно вливают кислоту в раствор, перемешивают и колбу закрывают пробкой. Хранят при температуре (23 ± 5) °С в вытяжном шкафу. Срок годности — 6 мес.

9.4.2 Приготовление смеси ацетонитрила и воды

Цилиндром вместимостью 1000 см³ отмеряют 600 см³ ацетонитрила и переносят в коническую колбу вместимостью 1000 см³. Затем тем же цилиндром отмеряют 100 см³ дистиллированной воды, переносят ее в колбу, смесь перемешивают несколькими вращательными движениями и колбу закрывают пришлифованной пробкой. Хранят при температуре (23 ± 5) °С. Срок годности — 6 мес.

9.4.3 Приготовление основных растворов микотоксинов

По 1 мг кристаллических микотоксинов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см³ смесью ацетонитрила и воды (см. 9.4.2).

Содержимое колб тщательно перемешивают до полного растворения микотоксинов, после чего объем в колбах доводят до метки той же смесью, содержимое колб вновь тщательно перемешивают, переносят в колбы вместимостью 100 см³ и закрывают пробкой. Массовые концентрации полученных растворов микотоксинов составляют 0,01 мг/см³ (10 мкг/см³). Основные растворы хранят в холодильнике в колбах, обернутых алюминиевой фольгой. Срок годности основных растворов микотоксинов — 1 год.

9.4.4 Приготовление вспомогательных растворов микотоксинов

Вспомогательные растворы микотоксинов хранят в холодильнике во флаконах вместимостью 2 см³, обернутых алюминиевой фольгой. Срок годности вспомогательных растворов микотоксинов — 1 год.

Приготовление вспомогательных растворов микотоксинов из основных растворов проводят по 9.4.4.1 — 9.4.4.3.

9.4.4.1 Приготовление растворов афлатоксина В₁ и роридина А

Микрошприцем вместимостью 0,01 см³ отмеряют по 0,001 см³ основных растворов микотоксинов и переносят их во флаконы вместимостью 2,0 см³. Микрошприцем вместимостью 0,5 см³ добавляют по

1,0 см³ смеси ацетонитрила и воды (см. 9.4.1), плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,00001 мг/см³ (0,01 мкг/см³).

9.4.4.2 Приготовление растворов охратоксина А и стеригматоцистина

Микрошприцем вместимостью 0,01 см³ отмеряют по 0,002 см³ основных растворов микотоксинов и переносят их во флаконы вместимостью 2,0 см³. Микрошприцем вместимостью 0,5 см³ добавляют по 1,0 см³ смеси ацетонитрила и воды (см. 9.4.1), плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,00002 мг/см³ (0,02 мкг/см³).

9.4.4.3 Приготовление растворов Т-2 токсина и зеараленона

Микрошприцем вместимостью 0,01 см³ отмеряют по 0,01 см³ основных растворов микотоксинов и переносят их во флаконы вместимостью 2,0 см³. Микрошприцем вместимостью 0,5 см³ добавляют по 0,99 см³ смеси ацетонитрила и воды (см. 9.4.1), плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,0001 мг/см³ (0,1 мкг/см³).

9.4.4.4 Приготовление раствора фумонизина В₁

Микрошприцем вместимостью 0,1 см³ отмеряют 0,1 см³ основного раствора микотоксина и переносят его во флакон вместимостью 2,0 см³. Микрошприцем вместимостью 0,5 см³ добавляют 0,9 см³ смеси ацетонитрила и воды (см. 9.4.1), плотно закрывают его крышкой, тщательно перемешивают раствор и наносят на флакон маркировку. Концентрация вспомогательного раствора составляет 0,001 мг/см³ (1,0 мкг/см³).

9.5 Подготовка рабочего журнала

9.5.1 В рабочем журнале вычерчивают контур, состоящий из двух одинаковых рамок со столбцами по восемь клеток в каждом, число которых соответствует числу полосок планшета, взятых в работу. Целесообразно анализировать число проб, кратное четырем, поскольку в этом случае требуется целое число полосок.

В клетках левой рамки значками 0, К0, К1, К2, К3 и цифрами, обозначающими номер пробы, указывают расположение вариантов, при этом для вариантов 0 и К1 берут по одной клетке, для остальных — по две и придерживаются хаотического их расположения. Клетки правой рамки оставляют свободными. Форма для записи результатов и пример расположения вариантов приведены в приложении Б.

9.5.2 В рабочем журнале вычерчивают таблицу для записи результатов измерений (приложение В).

На масштабнo-координатной бумаге вычерчивают перпендикулярные оси координат, наносят на оси абсцисс три разграничительных метки на расстоянии 35 мм друг от друга с цифровыми обозначениями, соответствующими десятичным логарифмам значений массовых концентраций калибровочных растворов микотоксинов К1, К2, К3, и общее обозначение оси — lg С, мкг/см³; на оси ординат — девять разграничительных меток на расстоянии 10 мм друг от друга с цифровыми обозначениями от 10 до 90 и общее обозначение оси — ОП/ОП₀ × 100, %.

9.6 Подготовка планшета к определению

Для приготовления рабочих растворов реактивов используют дистиллированную воду. Для каждого реактива и раствора используют отдельные сменные наконечники. Здесь и далее приведены расходы реактивов на две полоски планшета, для другого числа полосок - смешиваемые объемы пропорционально изменяют.

9.6.1 Приготовление и внесение в ячейки рабочего раствора АГ

Дозатором отмеряют 3,2 см³ воды и вливают в пробирку, затем отмеряют 0,8 см³ реактива БУФЕР-Р1 и добавляют в ту же пробирку с водой. Дозатором отмеряют 0,02 см³ реактива АГ, вливают его в раствор, перемешивают и наносят маркировку АГ. Дозатором отмеряют по 0,165 см³ раствора АГ и вливают во все ячейки.

9.6.2 Инкубация

Ячейки, заполненные раствором АГ, накрывают стеклянной или пластиковой крышкой, соответствующей размеру планшета, и оставляют на 16 ч в холодильной камере холодильного шкафа.

9.6.3 Приготовление рабочего раствора реактива БУФЕР-ОТ

Цилиндром вместимостью 100 см³ отмеряют 57 см³ воды и переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³. Дозатором добавляют 3,0 см³ реактива БУФЕР-ОТ, закрывают колбу пробкой, перемешивают, наносят маркировку ОТ.

9.6.4 Отмывка

Раствор из ячеек планшета, оставленный для инкубации в холодильной камере на 16 ч, сливают вытряхиванием. Дозатором отмеряют по 0,25 см³ раствора ОТ, вливают во все ячейки, оставляют на 2 мин и сливают вытряхиванием. Процедуру повторяют еще три раза.

9.7 Экстракция

Навески проб массой 10 г помещают в конические колбы вместимостью 100 см³. Цилиндром вместимостью 100 см³ отмеряют и добавляют к навескам грубых кормов (сено, солома) по 100 см³ смеси ацетонитрила и воды (см. 9.4.2), к навескам всех остальных кормов — по 50 см³ этой смеси. Колбы закрывают пробками, интенсивно встряхивают 3 — 4 раза круговыми движениями, не допуская разбрызгивания и попадания содержимого на горлышко и пробку, и оставляют на 16 ч при температуре 18 °С—22 °С. Затем содержимое колб с навесками проб интенсивно встряхивают 3—4 раза и фильтруют в другие колбы через бумажный фильтр, помещенный на воронку.

После окончания фильтрования колбы закрывают и наносят маркировки, соответствующие номерам проб. Полученные фильтраты именуются далее экстрактами.

10 Определение микотоксинов

10.1 Приготовление рабочего раствора реактива БУФЕР-Р2

Дозатором отмеряют 9,0 см³ воды, переливают в пробирку, добавляют 1,0 см³ реактива БУФЕР-Р2, перемешивают, наносят маркировку Р2.

10.2 Приготовление рабочих растворов экстрактов

Дозатором отмеряют по 0,27 см³ раствора Р2 и вливают их в пробирки. Дозатором отмеряют по 0,03 см³ экстрактов, вливают в пробирки, перемешивают и наносят маркировки, соответствующие номерам проб. Кратность разбавления экстрактов равна 10. При необходимости может быть использована кратность разбавления экстрактов более 10.

10.3 Приготовление рабочего раствора К0

Рабочий раствор К0 используют для дальнейшего разбавления рабочих растворов экстрактов и для приготовления рабочих растворов микотоксинов.

Дозатором отмеряют 1,35 см³ раствора Р2 и вливают его в пробирку. Дозатором отмеряют 0,15 см³ смеси ацетонитрила и воды (см. 9.4.2). Раствор перемешивают и наносят маркировку К0.

10.4 Приготовление рабочих растворов микотоксинов

Объемы рабочих растворов не изменяют в зависимости от числа полосок планшета, взятых в работу.

10.4.1 Приготовление рабочих растворов афлатоксина В₁, роридина А, стеригматоцистина, Т-2 токсина, зеараленона и охратоксина А

Дозатором в одну пробирку отмеряют 0,27 см³ раствора Р2 и в две пробирки — по 0,24 см³ раствора К0. Шприцем вместимостью 0,1 см³ отмеряют 0,03 см³ вспомогательного раствора микотоксина и вливают в первую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К1.

Дозатором отмеряют 0,06 см³ раствора К1, вливают во вторую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К2.

Дозатором отмеряют 0,06 см³ раствора К2, вливают в третью пробирку, перемешивают и наносят маркировку К3.

10.4.2 Приготовление рабочих растворов фумонизина В₁

Дозатором в одну пробирку отмеряют 0,27 см³ раствора Р2 и в две пробирки — по 0,27 см³ раствора К0. Шприцем вместимостью 0,1 см³ отмеряют 0,03 см³ вспомогательного раствора микотоксина и вливают в первую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К1.

Дозатором отмеряют 0,03 см³ раствора К1, вливают во вторую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К2.

Дозатором отмеряют 0,03 см³ раствора К2, вливают в третью пробирку, перемешивают и наносят маркировку К3.

Концентрации рабочих растворов микотоксинов, приготовляемых по 10.4, и соответствующие им значения десятичных логарифмов приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 — Концентрации вспомогательных и рабочих растворов микотоксинов (значения десятичных логарифмов концентраций рабочих растворов)

| Определяемый компонент | Концентрация вспомогательного раствора, мкг/см ³ | Концентрация рабочего раствора, С, мкг/см ³ (lg С) | | |
|--|---|---|---------------|----------------|
| | | К1 | К2 | К3 |
| Афлатоксин В ₁ Роридин А | 0,01 | 0,001 (—3,0) | 0,0002 (—3,7) | 0,00004 (—4,4) |
| Охратоксин А Стеригматоцистин | 0,02 | 0,002 (—2,7) | 0,0004 (—3,4) | 0,00008 (—4,1) |
| Т-2 токсин Зеараленон | 0,1 | 0,01 (—2,0) | 0,002 (—2,7) | 0,0004 (—3,4) |
| Фумонизин В ₁ | 1,0 | 0,1 (—1,0) | 0,01 (—2,0) | 0,001 (—3,0) |

10.5 Заполнение ячеек 0 и К0

Внесение растворов в ячейки проводят осторожно, не касаясь наконечником их дна и стенок. В три ячейки, обозначенные на контуре значками 0 и К0, дозатором вливают по 0,1 см³ раствора К0, а в ячейку 0 вливают дополнительно 0,1 см³ раствора Р2.

10.6 Заполнение ячеек К1, К2, К3, номер пробы

Дозатором отмеряют по 0,1 см³ растворов К1, К2, К3, рабочих растворов экстрактов и вносят в ячейки в соответствии с принятым размещением на контуре.

10.7 Приготовление и внесение в ячейки рабочих растворов реактива АТ

10.7.1 При определении афлатоксина В₁, роридина А, стеригматоцистина, Т-2 токсина, зеараленона и фумонизина В₁ дозатором отмеряют по 2,0 см³ раствора Р2 и вливают их в пробирки. Дозатором отмеряют по 0,04 см³ реактива АТ, соответствующего определяемому микотоксину, вливают его в раствор, перемешивают, наносят маркировку АТ.

10.7.2 При определении охратоксина А дозатором отмеряют 1,8 см³ раствора Р2 и 0,2 см³ реактива АНС, вливают их в пробирку. Дозатором отмеряют 0,04 см³ реактива АТ, соответствующего охратоксину А, вливают его в раствор, перемешивают и наносят маркировку АТ.

10.8 Внесение раствора АТ в ячейки

Дозатором отмеряют по 0,1 см³ раствора АТ, вливают во все ячейки, кроме одной, обозначенной на контуре значком 0.

10.9 Инкубация и отмывка

Планшет аккуратно встряхивают, накрывают крышкой и выдерживают 1 ч при температуре 22 °С—25 °С, встряхивая через каждые 10—15 мин. Отмывку проводят по 9.6.4.

10.10 Приготовление рабочего раствора реактива ФК и внесение в ячейки

Дозатором отмеряют 4,0 см³ раствора Р2 и вливают его в пробирку. Дозатором отмеряют 0,02 см³ реактива ФК, вливают его в раствор, перемешивают, наносят маркировку ФК. Дозатором отмеряют по 0,17 см³ раствора ФК и вливают во все ячейки.

10.11 Инкубация и отмывка

Инкубацию и отмывку ячеек планшета проводят по 10.9.

10.12 Приготовление рабочего раствора реактивов СУБСТРАТ и ФДА и внесение в ячейки

Дозатором отмеряют 3,2 см³ воды и вливают в пробирку. Дозатором отмеряют 0,8 см³ реактива СУБСТРАТ и 0,02 см³ реактива ФДА, добавляют их в воду, перемешивают. Дозатором отмеряют по 0,17 см³ полученного рабочего раствора и вливают его в каждую ячейку.

10.13 Инкубация

Планшет накрывают крышкой и выдерживают 45 мин в темноте при температуре 22 °С—25 °С.

10.14 Остановка реакции

Дозатором отмеряют по 0,05 см³ раствора для остановки ферментативной реакции (см. 9.4.1) и добавляют во все ячейки, планшет аккуратно встряхивают и оставляют на 10 мин при той же температуре.

10.15 Выполнение измерений

Измерение оптической плотности проводят согласно инструкции к данному типу прибора. Значения ОП считывают с точностью до второго десятичного знака и заносят их в журнал сначала в правую рамку формы для записи результатов (см. 9.5.1) и затем в таблицу (см. 9.5.2), располагая в соответствии с номерами вариантов.

11 Обработка результатов измерений

11.1 Рассчитывают среднеарифметическое значение оптической плотности для ячеек-дублей КО ($ОП_0$) и затем — среднеарифметические значения для ячеек-дублей всех остальных вариантов (ОП). Далее вычисляют значения $ОП/ОП_0$ с точностью до 0,01 и выражают их в процентах.

11.2 В подготовленной системе координат точки пересечения найденных значений $ОП/ОП_0 \times 100\%$ для вариантов К1, К2 и К3 и значений логарифмов концентраций рабочих растворов микотоксина К1, К2 и К3 соединяют. По значениям $ОП/ОП_0 \times 100\%$ для рабочего экстракта каждой пробы с помощью полученного графика определяют значения логарифмов концентраций микотоксина. Вычислением антилогарифмов этих значений с помощью микрокалькулятора находят соответствующие массовые концентрации микотоксина в рабочих растворах экстрактов в $мг/см^3$ с точностью до 0,00001.

11.3 Содержание микотоксина в каждой параллельной пробе X_i , $мг/кг$, вычисляют по формуле

$$X_i = \frac{C \cdot V \cdot K}{m}, \quad (1)$$

где C — массовая концентрация микотоксина в рабочем растворе экстракта, $мг/см^3$;

m — навеска пробы, взятая для анализа, г;

V — объем смеси ацетонитрила и воды, взятый для экстракции, $см^3$;

K — кратность разбавления экстракта при приготовлении рабочего раствора.

11.4 За результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов измерений, полученных для двух параллельных проб, если выполняется условие приемлемости:

$$\frac{2|X_1 - X_2|}{X_1 + X_2} 100 \leq r_{отн}, \quad (2)$$

где X_1 и X_2 — результаты измерений содержания микотоксина для двух параллельных проб;

$r_{отн}$ — предел повторяемости, приведенный в таблице 1.

Числовое значение результата определения должно содержать не более двух значащих цифр.

11.5 Результат определения содержания микотоксинов в анализируемой пробе в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$X \pm (1,96 S_{K(ТОЕ)}) \text{ мг/кг при доверительной вероятности } P = 0,95,$$

где X — содержание микотоксина в анализируемой пробе, $мг/кг$;

$S_{K(ТОЕ)}$ — стандартное отклонение промежуточной прецизионности, $мг/кг$.

Значение $S_{K(ТОЕ)}$ рассчитывают по формуле

$$S_{K(ТОЕ)} = 0,01 S_{K(ТОЕ)отн} X,$$

где $S_{K(ТОЕ)отн}$ — относительное стандартное отклонение, приведенное в таблице 1.

12 Контроль точности результатов измерения

12.1 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости), промежуточной прецизионности и воспроизводимости, проводится с учетом требований раздела 5 ГОСТ Р ИСО 5725-6.

12.2 Процедуры и периодичность контроля точности (контроля стабильности), получаемых результатов измерений в пределах лаборатории, проводят с учетом требований раздела 6 ГОСТ Р ИСО 5725-6.

13 Требования безопасности

13.1 Условия безопасного проведения работ

При выполнении аналитических измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами.

Электробезопасность при работе с электроустановками — по ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

13.2 Требования к квалификации операторов

Выполнение измерений производится лаборантом или химиком-аналитиком, владеющим техникой ИФА и изучившим инструкцию по эксплуатации используемой аппаратуры.

**Приложение А
(обязательное)**

Сведения по комплектации тест-систем

- 1 Реактив АТ — антитела к определяемому микотоксину
- 2 Реактив АГ — белковый конъюгат соответствующего микотоксина
- 3 Реактив ФК — антивидовой ферментный конъюгат
- 4 Реактив БУФЕР-ОТ (20-кратный концентрат) — солевой фосфатный буферный раствор с добавлением твина 20
- 5 Реактив БУФЕР-Р1 (5-кратный концентрат) — карбонат-бикарбонатный буферный раствор
- 6 Реактив БУФЕР-Р2 (10-кратный концентрат) — солевой фосфатный буферный раствор с добавлением твина 20 и бычьего сывороточного альбумина
- 7 Реактив СУБСТРАТ (5-кратный концентрат) — фосфат-цитратный буферный раствор с добавлением пероксида водорода
- 8 Реактив ФДА — о-фенилендиамин, 8 %-ный раствор
- 9 Реактив АНС — аммонийная соль 8-анилин-1-нафталинсульфокислоты, 0,5 %-ный раствор

**Приложение Б
(рекомендуемое)**

Форма для записи результатов

| | | | |
|----|----|--|--|
| 0 | K2 | | |
| 1 | K0 | | |
| K3 | 3 | | |
| 2 | 4 | | |
| K2 | K1 | | |
| 4 | 2 | | |
| K0 | 1 | | |
| 3 | K3 | | |

Приложение В
(рекомендуемое)

Таблица для записи результатов анализа

Т а б л и ц а В.1

| Маркировка варианта | Значение ОП | | ОП/ОП ₀ × 100, % | lg C | C |
|---------------------|-------------|-----------------|-----------------------------|------|---|
| | по ячейкам | среднее | | | |
| K0 | | ОП ₀ | 100 | — | — |
| K1 | | | | | |
| K2 | | | | | |
| K3 | | | | | |
| ... | | | | | |

Библиография

- | | |
|--------------------------------|--|
| [1] ТУ 9443-00113270117—96 | Фотометр для иммуноферментного анализа ИФА-ОЭП |
| [2] ТУ 64-16-55—90 | Дозаторы пипеточные |
| [3] ТУ 25-03-2152—76 | Микрошприц МШ-10 |
| [4] ТУ 16-6881032—84 | Шкаф сушильный |
| [5] ТУ 27-56-984—84 | Шкаф холодильный |
| [6] ТУ 61-1-721—79 | Дистиллятор ДЭ-4-2 |
| [7] ТУ 6-09-5437—91 | Ацетонитрил ч.д.в |
| [8] ТУ 9398-007-42442516—2002 | Тест-система для иммуноферментного определения афлатоксина В ₁ «Афлатоксин В.-ИФА» |
| [9] ТУ 9398-019-42442516—2002 | Тест-система для иммуноферментного определения роридина А «Роридин А-ИФА» |
| [10] ТУ 9398-013-42442516—2002 | Тест-система для иммуноферментного определения охратоксина А «Охратоксин А-ИФА» |
| [11] ТУ 9398-077-42442516—2002 | Тест-система для иммуноферментного определения стеригматоцистина «Стеригматоцистин-ИФА» |
| [12] ТУ 9398-004-42442516—2002 | Тест-система для иммуноферментного определения Т-2 токсина «Т-2 токсин-ИФА» |
| [13] ТУ 9398-010-42442516—2002 | Тест-система для иммуноферментного определения зеараленона «Зеараленон-ИФА» |
| [14] ТУ 9398-016-42442516—2002 | Тест-система для иммуноферментного определения фумонизина В ₁ «Фумонизин В ₁ -ИФА» |
| [15] ТУ 64-2-375—86 | Планшет 96-ячеечный полистироловый наборный |

УДК 636.086.001.4:006.354

ОКС 65.120

С19

ОКП 92 0000

Ключевые слова: корма, микотоксины, метод определения массовой концентрации, непрямой твердофазный иммуноферментный анализ

Редактор *Р.Г. Говердовская*
Технический редактор *О.Н. Власова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 09.02.2006. Подписано в печать 06.04.2006. Формат 60 × 84 $\frac{1}{8}$. Бумага офсетная Гарнитура Ариал.
Печать офсетная Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,35 Тираж 200 экз. Зак 212. С 2666.

ФГУП «Стандартинформ». 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «Стандартинформ» на ПЭВМ.
Отлечтано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. «Московский печатник». 105062 Москва, Лялин пер., 6.