МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31653— 2012

КОРМА

Метод иммуноферментного определения микотоксинов

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 июля 2012 г. № 50)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 сентября 2012 г. № 336-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31653—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 52471—2005*

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Май 2020 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

---

* Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 сентября 2012 г. № 336-ст ГОСТ Р 52471—2005 отменен с 1 июля 2013 г.

© Стандартинформ, оформление, 2012, 2020

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

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, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы 4
8 Подготовка к выполнению определения 5
9 Определение микотоксинов 7
10 Обработка результатов измерений 9
11 Требования безопасности 10
Приложение А (обязательное) Сведения по комплектации тест-систем 10
Приложение Б (рекомендуемое) Форма для записи результатов 11
Приложение В (рекомендуемое) Таблица для записи результатов анализа 11

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА

Метод иммуноферментного определения микотоксинов

Feedstuffs. Method of immunoenzyme mycotoxin determination

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает иммуноферментный метод определения содержания микотоксинов (афлатоксина В1, роридина А, охратоксина А, стеригматоцистина, Т-2 токсина, зеараленона, фумонизина 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 нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 8.315 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения

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

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

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

ГОСТ 334 Бумага масштабно-координатная. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 6709 Реактивы. Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13496.0 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 13586.3 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб

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

ГОСТ 24104 Весы лабораторные. Общие технические требования[1)]

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

ГОСТ 27262 Корма растительного происхождения. Методы отбора проб[2)]

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

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

[2)] Действует ГОСТ ISO 6497—2014.

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ 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 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, приготовляемый заблаговременно и необходимый для приготовления других типов растворов.

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

3.1.4 **рабочий раствор:** Раствор одного или нескольких реактивов, приготовляемый 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-нафталинсульфокислота;

ФДА — о-фенилендиамин;

ФК — антивидовой ферментный конъюгат;

МСО — межгосударственный стандартный образец;

БУФЕР-ОТ — солевой фосфатный буферный раствор с добавлением твина 20;

БУФЕР-Р1 — карбонат-бикарбонатный буферный раствор;

БУФЕР-Р2 — солевой фосфатный буферный раствор с добавлением твина 20 и бычьего сывороточного альбумина;

СУБСТРАТ — фосфат-цитратный буферный раствор с добавлением пероксида водорода.

4 Сущность иммуноферментного метода определения

Иммуноферментный 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 специфичными антителами в условиях конкуренции с белковым конъюгатом микотоксина, нанесенным на поверхность ячеек планшета,— твердофазным антигеном.

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 представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели прецизионности метода иммуноферментного определения микотоксинов

Определяемый компонент	Содержание, мг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости $S_{r\,отн}$, %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $S_{I\,(TOE)отн}$, %	Предел повторяемости $r_{отн}$, %	Предел промежуточной прецизионности $R_{I(TOE)отн}$, %
Афлатоксин B_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 Зеараленон	0,020—0,500	12	14	34	39
Фумонизин B_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 $R_{I(TOE)}$ 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, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы

Фотометр вертикального типа фотометрирования с диапазоном измерения оптической плотности от 0 до 2,5, с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного измерения не более ±0,005 в комплекте с интерференционным светофильтром для длин волн от 490 до 492 нм.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 высокого класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ±0,0002 г;

Шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий постоянство температуры (130 ± 5) °С.

Шкаф холодильный любого типа, обеспечивающий среднюю температуру в холодильной камере не выше 10 °С.

Дистиллятор любого типа.

Калькулятор любого типа с логарифмической функцией.

Цилиндры 1–25 (100, 1000) по ГОСТ 1770.

Колбы мерные 2–100 по ГОСТ 1770.

Дозаторы пипеточные для объемов доз 0,005—0,05; 0,02—0,2; 1—5 $см^3$ в комплектах со сменными одноразовыми наконечниками.

Микрошприц МШ-10 вместимостью 0,01 $см^3$.

Микрошприцы вместимостью 0,1 $см^3$ (категории Z 10,895-2) и 0,5 $см^3$ (категории Z 10,897-9) фирмы «Алдрич».

Планшет 96-ячеечный полистироловый наборный.

Пробирки П1–10 по ГОСТ 1770.

Колба коническая Кн–2–100(500, 1000) по ГОСТ 25336.

Воронки В-56–80 ХС по ГОСТ 25336.

Флаконы вместимостью 2 $см^3$ фирмы «Сигма» (категории Z 11, 508-8).

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Бумага масштабно-координатная марки Н-1 по ГОСТ 334.

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

Кислота серная концентрированная по ГОСТ 4204.

Натрий сернистокислый по нормативному документу.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Ацетонитрил, ч. д. а.

Препараты микотоксинов фирмы «Сигма»:

- афлатоксина B_1 (категории А 6636);
- роридина А (категории R 7502);
- охратоксина А (категории О 1877);
- стеригматоцистина (категории S 3255);
- Т-2 токсина (категории Т 4887);
- зеараленона (категории Z 2125);
- фумонизина B_1 (категории А1147).

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 B_1 в диапазоне концентраций от 0,00004 до 0,001 мкг/$см^3$;
- роридина А в диапазоне концентраций от 0,00004 до 0,001 мкг/$см^3$;
- охратоксина А в диапазоне концентраций от 0,00008 до 0,002 мкг/$см^3$;
- стеригматоцистина в диапазоне концентраций от 0,00008 до 0,002 мкг/$см^3$;

- Т-2 токсина в диапазоне концентраций от 0,0004 до 0,01 мкг/см^3;
- зеараленона в диапазоне концентраций от 0,0004 до 0,01 мкг/см^3;
- фумонизина B_1 в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,1 мкг/см^3.

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

8 Подготовка к выполнению определения

8.1 Подготовка проб

Отбор проб и их подготовка к определению следует проводить 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.

8.2 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.

8.3 Подготовка прибора к работе

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

8.4 Приготовление основных и вспомогательных растворов

8.4.1 Приготовление раствора для остановки ферментативной реакции

1,26 г безводного сернистокислого натрия помещают в колбу вместимостью 500 см^3. Цилиндром отмеряют 80,0 см^3 воды, вливают в колбу и перемешивают до полного растворения. Цилиндром отмеряют 20,0 см^3 концентрированной серной кислоты, осторожно вливают кислоту в раствор, перемешивают и колбу закрывают пробкой.

Срок годности раствора при температуре (23 ± 5) °С в вытяжном шкафу — 6 мес.

8.4.2 Приготовление смеси ацетонитрила и воды

Цилиндром отмеряют 600 см^3 ацетонитрила и переносят в коническую колбу вместимостью 1000 см^3. Затем тем же цилиндром отмеряют 100 см^3 дистиллированной воды, переносят ее в колбу, смесь перемешивают несколькими вращательными движениями и колбу закрывают пришлифованной пробкой. Хранят при температуре (23 ± 5) °С.

Срок годности смеси — 6 мес.

8.4.3 Приготовление основных растворов микотоксинов

По 1 мг кристаллических микотоксинов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см^3 смесью ацетонитрила и воды по 8.4.2.

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 см^3 и закрывают пробкой. Массовые концентрации полученных растворов микотоксинов составляют 0,01 мг/см^3 (10 мкг/см^3). Основные растворы хранят в холодильнике в колбах, обернутых алюминиевой фольгой.

Срок годности основных растворов микотоксинов — 1 г.

8.4.4 Приготовление вспомогательных растворов микотоксинов

8.4.4.1 Вспомогательные растворы микотоксинов хранят в холодильнике во флаконах вместимостью 2 см^3, обернутых алюминиевой фольгой.

Срок годности вспомогательных растворов микотоксинов — 1 г.

Приготовление вспомогательных растворов микотоксинов из основных растворов проводят по 8.4.4.2—8.4.4.5.

8.4.4.2 Для приготовления растворов афлатоксина B_1 и роридина А микрошприцем вместимостью 0,01 см^3 отмеряют по 0,001 см^3 основных растворов микотоксинов и переносят их во флаконы

вместимостью 2,0 см^3. Микрошприцем вместимостью 0,5 см^3 добавляют по 1,0 см^3 смеси ацетонитрила и воды по 8.4.2, плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,00001 мг/см^3 (0,01 мкг/см^3).

8.4.4.3 Для приготовления растворов охратоксина А и стеригматоцистина микрошприцем вместимостью 0,01 см^3 отмеряют по 0,002 см^3 основных растворов микотоксинов и переносят их во флаконы вместимостью 2,0 см^3. Микрошприцем вместимостью 0,5 см^3 добавляют по 1,0 см^3 смеси ацетонитрила и воды по 8.4.2, плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,00002 мг/см^3 (0,02 мкг/см^3).

8.4.4.4 Для приготовления растворов Т-2 токсина и зеараленона микрошприцем вместимостью 0,01 см^3 отмеряют по 0,01 см^3 основных растворов микотоксинов и переносят их во флаконы вместимостью 2,0 см^3. Микрошприцем вместимостью 0,5 см^3 добавляют по 0,99 см^3 смеси ацетонитрила и воды по 8.4.2, плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,0001 мг/см^3 (0,1 мкг/см^3).

8.4.4.5 Для приготовления раствора фумонизина B_1 микрошприцем вместимостью 0,1 см^3 отмеряют 0,1 см^3 основного раствора микотоксина и переносят его во флакон вместимостью 2,0 см^3. Микрошприцем вместимостью 0,5 см^3 добавляют 0,9 см^3 смеси ацетонитрила и воды по 8.4.2, плотно закрывают флакон крышкой, тщательно перемешивают раствор и наносят на флакон маркировку. Концентрация вспомогательного раствора составляет 0,001 мг/см^3 (1,0 мкг/см^3).

8.5 Подготовка рабочего журнала

8.5.1 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.

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

На масштабно-координатной бумаге вычерчивают перпендикулярные оси координат, наносят на оси абсцисс три разграничительные 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/см^3; на оси ординат — девять разграничительных меток на расстоянии 10 мм друг от друга с цифровыми обозначениями от 10 до 90 и общее обозначение оси — $ОП/ОП_0 \cdot 100$, %.

8.6 Подготовка планшета к определению

8.6.1 Для приготовления рабочих растворов реактивов используют дистиллированную воду.Наконечник меняют на другой (сменный) для приготовления каждого рабочего реактива и раствора. Здесь и далее приведены расходы реактивов на две полоски планшета, для другого числа полосок смешиваемые объемы пропорционально изменяют.

8.6.2 Приготовление и внесение в ячейки рабочего раствора АГ

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

8.6.3 Инкубация

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

8.6.4 Приготовление рабочего раствора реактива БУФЕР-ОТ

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

8.6.5 Отмывка

Раствор из ячеек планшета, оставленный для инкубации в холодильной камере на 16 ч, сливают вытряхиванием. Дозатором отмеряют по 0,25 см^3 раствора ОТ, вливают во все ячейки, оставляют на 2 мин и сливают вытряхиванием. Процедуру повторяют еще три раза.

8.7 Экстракция

Пробы массой 10 г помещают в конические колбы вместимостью 100 см^3. Цилиндром отмеряют и добавляют к навескам грубых кормов (сено, солома) по 100 см^3 смеси ацетонитрила и воды по 8.4.2, к пробам всех остальных кормов— по 50 см^3 этой смеси. Колбы закрывают пробками, интенсивно встряхивают 3 или 4 раза круговыми движениями, не допуская разбрызгивания и попадания содержимого на горлышко и пробку, и оставляют на 16 ч при температуре от 18 °С до 22 °С. Затем содержимое колб с навесками проб интенсивно встряхивают 3 или 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.

9 Определение микотоксинов

9.1 Приготовление рабочего раствора реактива БУФЕР-Р2

Дозатором отмеряют 9,0 см^3 воды, переливают в пробирку, добавляют 1,0 см^3 реактива БУФЕР-Р2, перемешивают, наносят маркировку Р2.

9.2 Приготовление рабочих растворов экстрактов

Дозатором отмеряют по 0,27 см^3 раствора Р2 и вливают их в пробирки. Дозатором отмеряют по 0,03 см^3 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.

9.3 Приготовление рабочего раствора К0

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

Дозатором отмеряют 1,35 см^3 раствора Р2 и вливают его в пробирку. Дозатором отмеряют 0,15 см^3 смеси ацетонитрила и воды (см. 8.4.2). Раствор перемешивают и наносят маркировку К0.

9.4 Приготовление рабочих растворов микотоксинов

9.4.1 Общие положения

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

9.4.2 Приготовление рабочих растворов афлатоксина B_1, роридина А, стеригматоцистина, Т-2 токсина, зеараленона и охратоксина А

Дозатором в одну пробирку отмеряют 0,27 см^3 раствора Р2 и в две пробирки — по 0,24 см^3 раствора К0. Шприцем вместимостью 0,1 см^3 отмеряют 0,03 см^3 вспомогательного раствора микотоксина и вливают в первую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К1.

Дозатором отмеряют 0,06 см^3 раствора К1, вливают во вторую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К2.

Дозатором отмеряют 0,06 см^3 раствора К2, вливают в третью пробирку, перемешивают и наносят маркировку К3.

9.4.3 Приготовление рабочих растворов фумонизина B_1

Дозатором в одну пробирку отмеряют 0,27 см^3 раствора Р2 и в две пробирки — по 0,27 см^3 раствора К0. Шприцем вместимостью 0,1 см^3 отмеряют 0,03 см^3 вспомогательного раствора микотоксина и вливают в первую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К1.

Дозатором отмеряют 0,03 см^3 раствора К1, вливают во вторую пробирку, раствор перемешивают и наносят маркировку К2.

Дозатором отмеряют 0,03 см^3 раствора К2, вливают в третью пробирку, перемешивают и наносят маркировку К3.

Концентрации рабочих растворов микотоксинов, приготовляемых по 9.4, и соответствующие им значения десятичных логарифмов приведены в таблице 2.

Таблица 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 B_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 B_1	1,0	0,1 (–1,0)	0,01 (–2,0)	0,001 (–3,0)

9.5 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 см^3 раствора К0, а в ячейку 0 вливают дополнительно 0,1 см^3 раствора Р2.

9.6 Заполнение ячеек К1, К2, К3, номер пробы

Дозатором отмеряют по 0,1 см^3 растворов К1, К2, К3, рабочих растворов экстрактов и вносят в ячейки в соответствии с принятым размещением на контуре.

9.7 Приготовление и внесение в ячейки рабочих растворов реактива АТ

9.7.1 При определении афлатоксина B_1, роридина А, стеригматоцистина, Т-2 токсина, зеараленона и фумонизина B_1 дозатором отмеряют по 2,0 см^3 раствора Р2 и вливают их в пробирки. Дозатором отмеряют по 0,04 см^3 реактива АТ, соответствующего определяемому микотоксину, вливают его в раствор, перемешивают, наносят маркировку АТ.

9.7.2 При определении охратоксина А дозатором отмеряют 1,8 см^3 раствора Р2 и 0,2 см^3 реактива АНС, вливают их в пробирку. Дозатором отмеряют 0,04 см^3 реактива АТ, соответствующего охратоксину А, вливают его в раствор, перемешивают и наносят маркировку АТ.

9.8 Внесение раствора АТ в ячейки

Дозатором отмеряют по 0,1 см^3 раствора АТ, вливают во все ячейки, кроме одной, обозначенной на контуре значком 0.

9.9 Инкубация и отмывка

Планшет аккуратно встряхивают, накрывают крышкой и выдерживают 1 ч при температуре от 22 °С до 25 °С, встряхивая через каждые 10—15 мин. Отмывку проводят по 8.6.5.

9.10 Приготовление рабочего раствора реактива ФК и внесение в ячейки

Дозатором отмеряют 4,0 см^3 раствора Р2 и вливают его в пробирку. Дозатором отмеряют 0,02 см^3 реактива ФК, вливают его в раствор, перемешивают, наносят маркировку ФК. Дозатором отмеряют по 0,17 см^3 раствора ФК и вливают во все ячейки.

9.11 Инкубация и отмывка

Инкубацию и отмывку ячеек планшета проводят по 9.9.

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

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

9.13 Инкубация

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

9.14 Остановка реакции

Дозатором отмеряют по 0,05 см^3 раствора для остановки ферментативной реакции по 8.4.1 и добавляют во все ячейки, планшет аккуратно встряхивают и оставляют на 10 мин при той же температуре.

9.15 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. 8.5.1) и затем в таблицу (см. 8.5.2), располагая в соответствии с номерами вариантов.

10 Обработка результатов измерений

10.1 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.

10.2 В подготовленной системе координат точки пересечения найденных значений $ОП/ОП_0 \cdot 100$ % для вариантов К1, К2 и К3 и значений логарифмов концентраций рабочих растворов микотоксина К1, К2 и К3 соединяют. По значениям $ОП/ОП_0 \cdot 100$ % 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 мкг/см^3 с точностью до 0,00001.

10.3 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, мкг/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.

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

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

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.

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

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

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

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

Значение $S_{I(TOE)}$ рассчитывают по формуле

$$S_{I(TOE)} = 0{,}01 \cdot S_{I(TOE)отн} \cdot X, \quad (3)$$

где $S_{I(TOE)\,отн}$ — относительное стандартное отклонение, приведенное в таблице 1.

11 Требования безопасности

11.1 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.

11.2 Требования к квалификации операторов

Выполнение измерений проводит лаборант или химик-аналитик, владеющий техникой ИФА и изучивший инструкцию по эксплуатации используемой аппаратуры.

Приложение А
(обязательное)

Сведения по комплектации тест-систем

А.1 Реактив АТ — антитела к определяемому микотоксину.

А.2 Реактив АГ — белковый конъюгат соответствующего микотоксина.

А.3 Реактив ФК — антивидовой ферментный конъюгат.

А.4 Реактив БУФЕР-ОТ (двадцатикратный концентрат) — солевой фосфатный буферный раствор с добавлением твина 20.

А.5 Реактив БУФЕР-Р1 (пятикратный концентрат) — карбонат-бикарбонатный буферный раствор.

А.6 Реактив БУФЕР-Р2 (десятикратный концентрат) — солевой фосфатный буферный раствор с добавлением твина 20 и бычьего сывороточного альбумина.

А.7 Реактив СУБСТРАТ (пятикратный концентрат) — фосфат-цитратный буферный раствор с добавлением пероксида водорода.

А.8 Реактив ФДА — о-фенилендиамин, 8 %-ный раствор.

А.9 Реактив АНС — аммонийная соль 8-анилин-1-нафталинсульфокислоты, 0,5 %-ный раствор.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Форма для записи результатов

0	К2			
1	К0			
К3	3			
2	4			
К2	К1			
4	2			
К0	1			
3	К3			

Приложение В
(рекомендуемое)

Таблица для записи результатов анализа

Таблица В.1

Маркировка варианта	Значение ОП		$ОП/ОП_0 \cdot 100$, %	lgC	C
	по ячейкам	среднее			
К0		$ОП_0$	100	—	—
К1					
К2					
К3					
...					

УДК 636.086.001.4:006.354 МКС 65.120

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

Редактор переиздания *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 12.05.2020. Подписано в печать 15.06.2020. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,35.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru