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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31709— 2012 (ISO 14674:2005)

МОЛОКО И СУХОЕ МОЛОКО

Определение содержания афлатоксина M_1. Очистка с помощью иммуноаффинной хроматографии и определение с помощью тонкослойной хроматографии

(ISO 14674:2005, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 1 октября 2012 г. № 51)

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
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1772-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31709—2012 (ISO 14674:2005) введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному стандарту ISO 14674:2005 Milk and milk powder. Determination of aflatoxin M_1 content. Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by thin-layer chromatography (Молоко и сухое молоко. Определение содержания афлатоксина M_1. Очистка с помощью иммуноаффинной хроматографии и определение с помощью тонкослойной хроматографии).

При этом дополнительные слова, фразы, абзацы, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики и особенностей межгосударственной стандартизации, выделены курсивом.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — модифицированная (MOD).

Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 52831—2007

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта публикуется в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты».

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 или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты»

© Стандартинформ, 2013

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 и определения . . . 2
4 *Сущность метода* . . . 2
5 Реактивы . . . 2
6 *Средства измерений и оборудование* . . . 3
7 Отбор проб . . . 4
8 *Подготовка* проб . . . 4
8.1 Молоко . . . 4
8.2 *Сухое* молоко . . . 4
8.3 Иммуноаффинная очистка . . . 5
9 *Проведение определения* . . . 5
9.1 Однонаправленная тонкослойная хроматография . . . 5
9.2 Двунаправленная тонкослойная хроматография . . . 5
10 *Обработка результатов* . . . 6
10.1 Вычисление . . . 6
10.2 *Оценка результатов* . . . 7
11 Прецизионность . . . 7
11.1 Межлабораторные испытания . . . 7
11.2 *Пределы повторяемости и воспроизводимости* . . . 7
12 Протокол испытания . . . 7
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний . . . 8
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам . . . 9
Библиография . . . 10

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МОЛОКО И СУХОЕ МОЛОКО

Определение содержания афлатоксина M_1. Очистка с помощью иммуноаффинной хроматографии и определение с помощью тонкослойной хроматографии

Milk and milk powder. Determination of aflatoxin M_1 content. Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by thin-layer chromatography

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на молоко и сухое молоко и устанавливает метод определения содержания афлатоксина M_1 с помощью тонкослойной хроматографии с предварительной очисткой с использованием иммуноаффинной хроматографии.

Минимально определяемое количество афлатоксина M_1 составляет 2 нг, что соответствует приблизительно 0,10 мкг/дм^3 для молока или разбавленного сухого молока.

2 *Нормативные ссылки*

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ ISO 5725-1—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ ISO 5725-2—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ 1770—74 (ISO 1042—83, ISO 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 5789—78 Реактивы. Толуол. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 22300—76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов (и классификаторов) на территории государства по соответствующему указателю стандартов (и

Издание официальное

классификаторов), составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **содержание афлатоксина M_1:** *Массовая концентрация* афлатоксина M_1, *выраженная в мкг/дм^3 для молока, или массовая доля афлатоксина* M_1, *выраженная в мкг/кг для сухого молока,* определенная методом, установленным в настоящем стандарте.

3.2 ***аналитический выход*** *(recovery): Отношение массы, массовой доли или массовой концентрации определяемого компонента, найденное данным методом, к действительному значению соответствующей величины в исходном образце.*

4 *Сущность метода*

Афлатоксин M_1 экстрагируют, пропуская пробу через иммуноаффинную колонку, содержащую специфические антитела, связанные с твердым материалом субстрата. Когда проба проходит через колонку, антитела селективно связываются с любым присутствующим афлатоксином M_1 (антигеном) и образуют комплекс антитело-антиген. Все другие компоненты основного состава пробы вымываются из колонки водой. Затем афлатоксин M_1 элюируют из колонки смесью ацетонитрил/метанол. В соответствии с концентрацией элюата количество афлатоксина M_1 определяют методом однонаправленной тонкослойной хроматографии. В случае возникновения помех проводят двунаправленную тонкослойную хроматографию, чтобы отделить афлатоксин M_1 от примесей.

5 Реактивы

При отсутствии специальных указаний используют реактивы только признанных аналитических марок.

Вода должна соответствовать требованиям ГОСТ 6709. Вода не должна содержать органические примеси.

5.1 Чистые растворители

5.1.1 Хлороформ *по ГОСТ 20015.*

5.1.2 Ацетонитрил.

5.1.3 Диэтиловый эфир *по ГОСТ 22300.*

5.1.4 Метанол *по ГОСТ 6995.*

5.1.5 Толуол *по ГОСТ 5789.*

5.1.6 Ацетон *по ГОСТ 2603.*

5.1.7 Изопропанол.

5.2 *Смесь* ацетонитрил/метанол, *в объемном соотношении* 3:2

Смесь приготовляют, добавляя 30 см^3 ацетонитрила (см. 5.1.2) к 20 см^3 метанола (см. 5.1.4), и перемешивают.

5.3 *Смесь* толуол/ацетонитрил, *в объемном соотношении* 9:1

Смесь приготовляют, добавляя 9 см^3 толуола (см. 5.1.5) к 1 см^3 ацетонитрила (см. 5.1.2), и перемешивают. Этот раствор используют для повторного суспендирования *стандартных* растворов афлатоксина M_1 (см. 5.5) и выпаренного элюата перед *проведением анализа методом тонкослойной хроматографии.*

5.4 *Растворители для проведения тонкослойной хроматографии*

5.4.1 Раствор для однонаправленной *тонкослойной хроматографии*

Приготовляют 100 см^3 раствора для однонаправленной *тонкослойной хроматографии* путем добавления *4* см^3 метанола (см. 5.1.4) и 1 см^3 воды к 95 см^3 диэтилового эфира (см. 5.1.3) и тщательно перемешивают (объемное отношение 95:4:1).

5.4.2 Раствор для двунаправленной *тонкослойной хроматографии*

Приготовляют 100 см^3 раствора для двунаправленной тонкослойной хроматографии путем добавления 10 см^3 ацетона (см. 5.1.6) и 3 см^3 изопропанола (см. 5.1.7) к 87 см^3 хлороформа (см. 5.1.1) и тщательно перемешивают (объемное отношение 87:10:3).

5.5 *Стандартный* раствор афлатоксина M_1

5.5.1 *Основной стандартный* раствор афлатоксина M_1

Приготовляют *основной стандартный* раствор афлатоксина M_1 с номинальной концентрацией афлатоксина M_1 10 мкг/см^3 (см. 5.1.1) путем повторного суспендирования 10 мкг лиофилизированной пленки афлатоксина M_1 в 1 см^3 хлороформа.

Согласно протоколу АОАС [1] концентрацию основного стандартного раствора афлатоксина M_1 определяют путем измерения его *оптической плотности при длине волны максимального поглощения в диапазоне длин волн 200—400 нм относительно хлороформа (см. 5.1.1), применяемого в качестве образца сравнения.*

Контролируют чистоту афлатоксина M_1, регистрируя спектр в интервале 200—400 нм. Измеряют *оптическую плотность (А)* при длине волны максимума поглощения ($\lambda_{макс}$), близкой к 365 нм. Вычисляют массовую концентрацию *с*, мкг/см^3, по формуле

$$c = AM \cdot 100/\varepsilon, \quad (1)$$

где *А* — числовое значение *оптической плотности*, измеренной при $\lambda_{макс}$;

М — числовое значение молярной массы афлатоксина M_1, г/моль (*М* = 328 г/моль);

ε — числовое значение *молярного* коэффициента поглощения афлатоксина M_1 в хлороформе, м^2/моль (ε = 1995 м^2/моль).

Основной стандартный раствор афлатоксина M_1 *хранят* в хорошо закупоренном пузырьке *из темного стекла*, защищенном от света, при температуре ниже 0 °С.

Срок хранения основного стандартного раствора афлатоксина M_1 — один год.

5.5.2 *Рабочий стандартный* раствор афлатоксина M_1

5.5.2.1 Рабочий раствор А

Используют мерную пипетку или микрошприц (см. 6.2) для помещения 50 мм^3 рабочего стандартного раствора афлатоксина M_1 (см. 5.5.1) в пузырек. *Раствор упаривают досуха.* Повторно суспендируют *сухой остаток* с 500 мм^3 *смеси* толуол/ацетонитрил (см. 5.3), чтобы получить *рабочий стандартный* раствор афлатоксина M_1 с концентрацией 1 мкг/см^3 (рабочий раствор А). Раствор А используют для нанесения его на пластинки *для тонкослойной хроматографии при исследовании проб* с высоким уровнем загрязнения или когда *массовая концентрация афлатоксина M_1 близка* к 0,50 мкг/дм^3.

5.5.2.2 Рабочий раствор В

Помещают 100 мм^3 раствора А в пузырек. Добавляют 900 мм^3 смеси толуол/ацетонитрил (см. 5.3), чтобы получить рабочий стандартный раствор афлатоксина M_1 с концентрацией 0,1 мкг/см^3 (рабочий раствор В). Раствор В используют для нанесения его на пластинки тонкослойной хроматографии при исследовании проб с низким уровнем загрязнения или когда *массовая концентрация афлатоксина M_1 близка* к 0,10 мкг/дм^3.

6 *Средства измерений и оборудование*

Используют обычное лабораторное оборудование и, в частности:

6.1 Мерные пипетки требуемой *вместимости по ГОСТ 29227.*

6.2 Микрошприцы.

6.3 Лабораторную стеклянную посуду: стеклянные колбы и воронки соответствующей *вместимости по ГОСТ 25336.*

6.4 Колбу мерную с одной меткой *вместимостью* 200 см^3 *по ГОСТ 1770.*

6.5 Цилиндр *мерный вместимостью* 100 см^3 *по ГОСТ 1770.*

6.6 Одноразовые шприцы *вместимостью* 10 и 100 см^3.

6.7 Стеклянную *пробирку с коническим дном вместимостью* 5 см^3 для сбора экстракта после этапа очистки *по ГОСТ 1770.*

6.8 Испарительную систему, испаритель роторный или *оборудование, позволяющее получать слабый поток азота.*

6.9 Спектрометр *с диапазоном измерения, позволяющим проводить исследования при длинах волн от* 200 *до* 400 нм, *снабженный кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 10 мм.*

6.10 Термостат водяной, *поддерживающий* температуру *от* 35 °С до 37 °С.

6.11 Центрифугу, обеспечивающую радиальное ускорение *не менее* 2000 g и охлаждение до 4 °С.

6.12 Бумагу фильтровальную *по ГОСТ 12026.*

6.13 Иммуноаффинные колонки.

Иммуноаффинные колонки должны содержать антитела относительно афлатоксина M_1. Максимальная емкость колонок должна быть не менее 100 нг афлатоксина M_1 (что соответствует 1 мкг/дм^3 или 10 мкг/кг, когда используют 100 см^3 пробы для анализа). Они должны давать *выход афлатоксина M_1 не менее 80 % для массы* 4 нг токсина (что соответствует 0,04 мкг/дм^3 или 0,40 мкг/кг на 100 см^3 пробы для анализа). Допускается использовать любую иммуноаффинную колонку, удовлетворяющую *вышеуказанным* рабочим характеристикам.

6.14 Весы *лабораторные* с точностью взвешивания до 0,1 г *по ГОСТ 24104.*

6.15 Магнитную мешалку.

6.16 Мешалку вихревого типа.

6.17 Вакуумную систему для иммуноаффинного картриджа.

6.18 Шкаф сушильный *(термостат), обеспечивающий поддержание* температуры 50 °С.

6.19 Камеру для тонкослойной хроматографии.

6.20 Пластинки для тонкослойной хроматографии, размером 10 × 10 см или 20 × 20 см, с силикагелем 60, сделанные из стекла или алюминия.

6.21 Ультрафиолетовую лампу, *излучающую при длине волны* 365 нм.

6.22 Денситометр.

7 Отбор проб

7.1 Отбор проб — по ГОСТ 26809 и [2].

В лабораторию направляют представительные пробы, которые не были повреждены в процессе хранения и транспортирования.

8 *Подготовка* проб

8.1 Молоко

Пробу нагревают в термостате (см. 6.10) до (35 ± 2) °С, чтобы растворить слой жира для получения хорошей гомогенизации пробы для анализа, при умеренном перемешивании.

Гомогенизированную пробу для анализа центрифугируют (см. 6.11) при радиальном ускорении 2000 g не менее 15 мин. Пробу охлаждают для лучшего отделения жира и верхний тонкий слой жира удаляют. *При необходимости* проводят фильтрование через один или более листов фильтровальной бумаги (см. 6.12). Собирают *не менее* 100 см^3 приготовленной таким образом пробы для анализа.

8.2 *Сухое* молоко

20,0 г навески пробы с точностью до 0,1 г помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3 и растворяют со 150 см^3 воды, предварительно нагретой при *температуре от* 50 °С *до* 60 °С. Полученный раствор перемешивают магнитной мешалкой (см. 6.15) в течение 10 мин.

Испытуемый раствор оставляют охлаждаться до комнатной температуры. Затем осторожно *переносят* весь раствор в мерную колбу вместимостью 200 см^3 (см. 6.4). Разбавляют до метки водой. Закрывают колбу и встряхивают ее содержимое для получения хорошо гомогенизированного раствора.

Центрифугируют (см. 6.11) *испытуемый* раствор при радиальном ускорении 2000 g *не менее* 15 мин. Раствор охлаждают для лучшего отделения жира и удаляют верхний тонкий слой жира. *При необходимости* проводят фильтрование через один или более листов фильтровальной бумаги (см. 6.12). Собирают *не менее* 100 см^3 приготовленной пробы для испытания.

8.3 Иммуноаффинная очистка

Иммуноаффинной колонке (см. 6.13) дают достигнуть комнатной температуры. Присоединяют шприц к верхней части иммуноаффинного картриджа. Отбирают 100 см^3 приготовленного испытуемого раствора (см. 8.1 или 8.2), используя *мерный цилиндр вместимостью* 100 см^3 (см. 6.5) или пипетку.

Переводят анализируемую пробу в шприц и пропускают через иммуноаффинную колонку с *постоянной медленной скоростью потока* около 2—3 см^3/мин. Используют гравитационную или вакуумную систему (см. 6.17) для контроля скорости потока. Не следует допускать *высыхания* колонки. Промывают колонку, используя 40 см^3 воды при постоянной медленной скорости потока. После промывки колонку продувают *досуха*, промывочный раствор выбрасывают.

Устанавливают другой сухой чистый шприц на картридж. Медленно элюируют афлатоксин M_1 из колонки, пропуская 2,5 см^3 *смеси* ацетонитрил/метанол (см. 5.2) и затем 2,5 см^3 чистого метанола (5.1.4). Дают этим растворам контактировать с колонкой не менее 1 мин при соблюдении постоянной медленной скорости потока. Затем продувают колонку *досуха*.

Собирают элюат в *пробирку с коническим дном* и выпаривают *до минимального объема (1—2 капли)*, используя роторный испаритель (см. 6.8) при температуре ≤ 40 °С или используя слабый поток азота. Не следует испарять элюат до полной сухости, это позволит достичь хорошего повторного суспендирования афлатоксина M_1, присутствующего в остатке пробы.

Добавляют 200 мм^3 чистого ацетонитрила (см. 5.1.2) к остатку пробы. Закрывают *пробирку* и интенсивно перемешивают, используя мешалку вихревого типа (см. 6.16), в течение 1 мин. Испаряют снова *до минимального объема (1—2 капли)*, используя роторный испаритель (см. 6.8) при температуре ≤ 40 °С или слабый поток азота.

Примечание — Предыдущий этап необходим, чтобы избежать образования эмульсии и получить хорошее повторное суспендирование при добавлении *смеси* толуол/ацетонитрил.

Открывают пробирку и добавляют 100 мм^3 *смеси* толуол/ацетонитрил (см. 5.3) к остатку пробы. Закрывают пробирку и снова интенсивно перемешивают, используя мешалку вихревого типа (см. 5.16), в течение 1 мин. Очищенную таким образом пробу для анализа хранят до начала процедуры.

9 Проведение определения

9.1 Однонаправленная тонкослойная хроматография

На пластинку тонкослойной хроматографии (см. 6.20) *наносят* 10—20 мм^3 очищенной пробы по 8.3. Добавляют аликвоты, например, по 5, 10, 20 мм^3 соответствующего *рабочего стандартного* раствора афлатоксина M_1, приготовленного по 5.5.2 (раствор А или В).

Пластинку помещают в камеру для тонкослойной хроматографии (см. 6.19), содержащую раствор для однонаправленной тонкослойной хроматографии (см. 5.4.1). *Хроматографию* проводят до тех пор, пока *фронт растворителя* не достигнет высоты *примерно* 10 см.

Удаляют пластинку из *камеры* и оставляют ее сохнуть на воздухе. Считывают полученные пятна, используя ультрафиолетовую лампу (см. 6.21) или денситометр (см. 6.22) при 365 нм. Сравнивают *интенсивность флуоресценции* пятна на *хроматограмме пробы* с интенсивностями, полученными для *рабочих стандартных* растворов афлатоксина M_1.

Вычисляют содержание афлатоксина M_1 в анализируемой пробе, как описано в разделе 10.

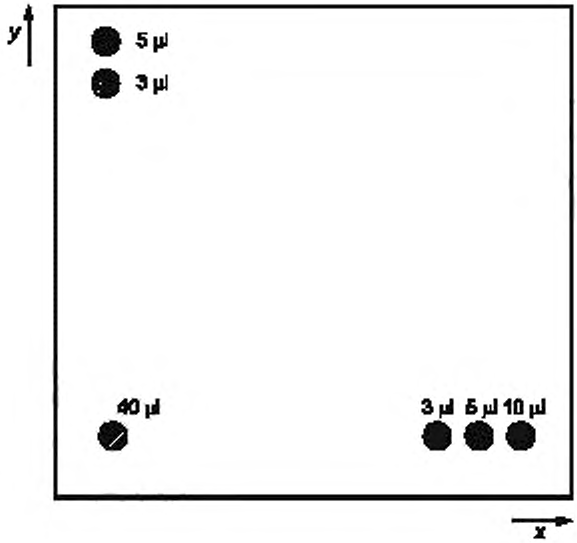
Если *интенсивность флуоресценции* пятна на *хроматограмме пробы* выше по сравнению с рабочим стандартным раствором афлатоксина M_1 самой высокой *интенсивности флуоресценции, то* оценивают уровень загрязнений. Исходя из этого уровня, разбавляют очищенную пробу для анализа (см. 8.3) подходящим объемом *смеси* толуол/ацетонитрил (см. 5.3).

Повторяют процедуру с разбавленной очищенной пробой, описанную в настоящем подразделе.

9.2 Двунаправленная тонкослойная хроматография

При появлении на хроматограмме помех вблизи флуоресцирующих пятен проводят двунаправленную тонкослойную хроматографию. *Наносят* на пластинку *для тонкослойной хроматографии* (см. 6.20) 20 мм^3 очищенной пробы для анализа (см. 8.3). Добавляют по 5, 10, 20 мм^3 *рабочего стандартного* раствора афлатоксина M_1, приготовленного, как описано в 5.5.2, чтобы пропустить его в направлении 1, и по 5, 10, 20 мм^3 того же самого *рабочего стандартного* раствора афлатоксина M_1 (см. 5.5.2), чтобы пропустить его в направлении 2 (см. рисунок 1).

Помещают пластинку в *камеру тонкослойной хроматографии* (см. 6.19), содержащую раствор для однонаправленной *тонкослойной хроматографии* (см. 5.4.1). *Хроматографируют (элюируют)* пластинку в первом направлении до тех пор, пока *фронт подвижной фазы* не достигнет высоты *примерно* 7 см. Удаляют пластинку из камеры и оставляют ее сохнуть на воздухе.



Ось *x* — направление 2, ось *y* — направление 1

Рисунок 1 — Двунаправленная тонкослойная хроматография

Нагревают сухую пластину в сушильном шкафу (термостате) (см. 6.18) при *температуре* 50 °С в течение 5 мин. Охлаждают пластинку и помещают ее в другую *камеру для тонкослойной хроматографии для элюирования в направлении 2.* Хроматографируют (элюируют) пластинку во втором направлении до тех пор, пока *фронт растворителя* не достигнет высоты около 7 см.

Удаляют пластинку из *камеры* и оставляют ее сохнуть на воздухе. Считывают полученные пятна, используя ультрафиолетовую лампу (см. 6.21) или денситометр (см. 6.22) при 365 нм. Сравнивают интенсивность флуоресценции пятна на испытательном образце с интенсивностями, полученными для *рабочих стандартных* растворов афлатоксина M_1.

Вычисляют содержание афлатоксина M_1 в анализируемой пробе, как описано в разделе 10. Если интенсивность флуоресценции пятна на *хроматограмме пробы* выше по сравнению с *рабочим стандартным* раствором афлатоксина M_1 самой высокой *интенсивности флуоресценции, то* повторяют процедуру с очищенной пробой меньшего объема (см. 8.3), как описано в настоящем подразделе.

После анализа методом *тонкослойной хроматографии* оставшуюся очищенную пробу для анализа хранят в закрытом пузырьке или *морозильной камере* для дальнейшего количественного анализа или подтверждения идентичности.

10 Обработка результатов

10.1 Вычисление

Вычисляют массовую концентрацию или массовую долю афлатоксина M_1 в пробе (см. 8.1 или 8.2) W_A, мкг/дм^3 или мкг/кг, используя следующее уравнение

$$W_A = \frac{v_s \cdot c_s \cdot v_1}{v_2 \cdot m_t}, \qquad (2)$$

где v_s — численное значение объема рабочего стандартного раствора А или В (см. 5.5.2), сравнимое с объемом анализируемой пробы (см. 9.1 или 9.2) и используемое в вычислении, мм^3;

c_s — массовая концентрация афлатоксина M_1 используемого рабочего стандартного раствора А или В (см. 5.5.2), сравнимая с объемом анализируемой пробы (см. 9.1 или 9.2) и используемая в вычислении, нг/мм^3;

v_1 — объем растворенного остатка, мм^3 (v_1 = 100 мм^3);

v_2 — объем (см. 9.1 или 9.2) очищенной анализируемой пробы, сопоставимый с объемом рабочего стандартного раствора А или В (см. 5.5.2) и используемый в вычислении, мм^3;

m_t — объем (см. 8.1) или масса (см. 8.2) пробы, см^3 или г.

10.2 *Оценка результатов*

За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, округленное до двух значащих цифр.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторные испытания

Подробная информация о межлабораторных испытаниях для определения прецизионности метода приведена в приложении А. *Применение результатов межлабораторных испытаний возможно только для указанных в таблице А.1 уровней загрязнения афлатоксином M_1 проб молока, сырого и сухого молока.*

11.2 *Пределы повторяемости и воспроизводимости*

Значения пределов повторяемости (абсолютной разности между двумя независимыми результатами единичных испытаний, полученных одним и тем же оператором при использовании одного и того же оборудования в пределах короткого интервала времени) и воспроизводимости (абсолютной разности между двумя результатами испытаний, полученных одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях) для доверительной вероятности 0,95 приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Значения пределов повторяемости и воспроизводимости (в мкг/дм^3 для жидких проб и мкг/кг для твердых проб)

Уровни загрязнений, для которых приведены пределы повторяемости и воспроизводимости	Предел повторяемости r		Предел воспроизводимости R	
	A	B	A	B
Жидкие пробы				
Низкий (L1)	0,17	0,10	0,18	0,14
Высокий (L2)	0,63	0,96	0,84	0,96
Твердые пробы (сухое молоко)				
Низкий (P1)	0,73	1,04	1,01	1,25
Высокий (P2)	3,04	5,79	5,06	8,63
Примечание — A — нескорректированные данные; B — данные, скорректированные с учетом выхода афлатоксина M_1; условные обозначения уровней загрязнения — по приложению А.				

12 Протокол испытания

В протоколе испытания должны быть указаны:

a) вся информация, необходимая для полной идентификации пробы;

b) метод отбора проб (если известен);

c) используемый метод испытания со ссылкой на *настоящий* стандарт;

d) все рабочие подробности, не установленные в этом стандарте или рассматриваемые как факультативные, с *особенностями*, которые могли повлиять на окончательный(е) результат(ы) испытания;

e) полученные результаты или, в случае проверки повторяемости, конечный объявленный результат.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

В международных испытаниях проб жидкого молока участвовало девять лабораторий, проб сухого молока — одиннадцать лабораторий, испытания проводились на параллельных пробах. Пробы жидкого молока для анализа имели два уровня загрязнения: 0,13 мкг/дм^3 (L1) и 0,68 мкг/дм^3 (L2). Пробы сухого молока для анализа имели также два уровня загрязнения: 1,17 мкг/кг (P1) и 5,49 мкг/кг (P2). Статистический анализ проводился по нескорректированным результатам и по результатам, которые были скорректированы для *аналитического выхода*.

Испытания были организованы AFSSA-LERHQA (Франция). Содержание афлатоксина M_1 в *пробах загрязненного молока, разосланных участникам*, определяли с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, описанного в [3].

Для нахождения данных по прецизионности, приведенных в таблице А.1, полученные результаты подвергали статистическому анализу согласно ГОСТ ISO 5725-1 и ГОСТ ISO 5725-2.

Таблица А.1 — Результаты межлабораторных испытаний

Наименование показателя	Партии							
	L1		L2		P1		P2	
	A[A]	B[b]	A[a]	B[b]	A[a]	B[b]	A[a]	B[b]
Ожидаемые значения, мкг/дм^3 или мкг/кг	0,13	0,13	0,68	0,68	1,17	1,17	5,49	5,49
Число участвующих лабораторий	9	8	11	11	9c	10	11	10
Общее среднее значение, мкг/дм^3 или мкг/кг	0,13	0,14	0,46	0,63	0,65	0,93	3,36	5,74
Стандартное отклонение для повторяемости, мкг/дм^3 или мкг/кг	0,06	0,04	0,22	0,34	0,26	0,37	1,08	2,04
Относительное стандартное отклонение для повторяемости, %	45,10	25,90	48,70	54,10	40,10	39,30	32,00	35,60
Предел повторяемости при 95 % R, мкг/дм^3 или мкг/кг	0,17	0,10	0,63	0,96	0,73	1,04	3,04	5,79
Стандартное отклонение для воспроизводимости S_r, мкг/дм^3 или мкг/кг	0,06	0,05	0,25	0,30	0,36	0,44	1,79	3,05
Относительное стандартное отклонение для воспроизводимости, %	49,00	33,70	55,10	46,90	55,40	47,50	53,30	53,10
Предел воспроизводимости при 95 % R, мкг/дм^3 или мкг/кг	0,18	0,14	0,72	0,84	1,01	1,25	5,06	8,63

[a] A — нескорректированные данные.

[b] B — данные, скорректированные для выхода афлатоксина M_1.

[c] По тесту Кохрана *из дальнейшей обработки были исключены результаты семи лабораторий для партии P1.*

[d] По тесту Кохрана *из дальнейшей обработки были исключены результаты семи лабораторий для партии P1. Несмотря на то, что* по тесту Кохрана следовало исключить данные из шести лабораторий для партии P2, *их результаты были использованы в дальнейшей обработке.*

Примечание — L — жидкие пробы, P — порошковые пробы.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 5725-1:1994 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения	IDT	ГОСТ ISO 5725-1—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения
ISO 5725-2:1994 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений	IDT	ГОСТ ISO 5725-2—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
ISO 1042:83 Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой ISO 4788:80 Посуда лабораторная стеклянная. Градуированные мерные цилиндры	MOD MOD	ГОСТ 1770—74 (ISO 1042—98, ISO 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
*	—	ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия
*	—	ГОСТ 5789—78 Реактивы. Толуол. Технические условия
*	—	ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
*	—	ГОСТ 6995—77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия
*	—	ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
*	—	ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия
*	—	ГОСТ 22300—76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия
*	—	ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования
*	—	ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
*	—	ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу
ISO 835-1:81 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования	MOD	ГОСТ 29227—91 (ISO 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

* Соответствующий международный стандарт отсутствует.

Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты;
- MOD — модифицированные стандарты.

Библиография

[1] AOAC 199549.3.02(980.21 Method)

[2] ISO 707:1997 Milk and milk products — Guidance on sampling (Молоко и молочные продукты. Руководство по отбору проб)

[3] ISO 14501:2007 Milk and milk powder — Determination of aflatoxin M_1 content — Cleanup by immunoaffinity chromatography and determination by highperformance liquid chromatography (Молоко и сухое молоко. Определение содержания афлатоксина M_1. Очистка иммуноаффинной хроматографией и определение с помощью высокоэффективной жидкостной)

УДК 637.544:006.354 МКС 67.100.10 Н09 MOD

Ключевые слова: молоко, сырое молоко, сухое молоко, афлатоксин M_1, хроматография, иммуноаффинная хроматография, тонкослойная хроматография

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 18.04.2013. Подписано в печать 17.06.2013. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 153 экз. Зак. 504.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru