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

gost.e-ecolog.ru

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

© Стандартинформ, 2006

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 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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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 B_1, роридин А, охратоксин А, стеригматоцистин, Т-2 токсин, зеараленон, фумонизин B_1) 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

Издание официальное

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, 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.

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 (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.

Таблица 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 $S_{I(TOE)\,\text{отн}}$, %	Предел повторяемости $r_{\text{отн}}$, %	Предел промежуточной прецизионности $R_{I(TOE)\,\text{отн}}$, %
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 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 ± 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 ± 0,0002 г;

цилиндры по ГОСТ 1770 исполнения 1 вместимостью 25, 100, 1000 $см^3$;

колбы по ГОСТ 1770 исполнения 2 вместимостью 100 $см^3$;

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

микрошприц МШ-10 вместимостью 0,01 $см^3$ [3];

микрошприцы вместимостью 0,1 $см^3$ (кат. № Z 10,895-2) и 0,5 $см^3$ (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 B_1 (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 B_1 (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 B_1 в диапазоне концентраций 0,00004—0,001 мкг/$см^3$ [8],

роридина А в диапазоне концентраций 0,00004—0,001 мкг/$см^3$ [9],

охратоксина А в диапазоне концентраций 0,00008—0,002 мкг/$см^3$ [10],

стеригматоцистина в диапазоне концентраций 0,00008—0,002 мкг/$см^3$ [11],

Т-2 токсина в диапазоне концентраций 0,0004—0,01 мкг/$см^3$ [12],

зеараленона в диапазоне концентраций 0,0004—0,01 мкг/$см^3$ [13],

фумонизина B_1 в диапазоне концентраций 0,001—0,1 мкг/см^3 [14];
планшет 96-ячеечный полистироловый наборный [15];
пробирки по ГОСТ 1770 исполнения 1 вместимостью 10 см^3;
колбы по ГОСТ 25336 типа Кн вместимостью 100 , 500, 1000 см^3;
воронки по ГОСТ 25336 В-56-80 ХС;
флаконы вместимостью 2 см^3 , фирма «Сигма» (кат. № Z 11, 508-8);
бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
бумагу масштабно-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 сернистокислого натрия помещают в колбу вместимостью 500 см^3. Цилиндром вместимостью 100 см^3 отмеряют 80,0 см^3 воды, вливают в колбу и перемешивают до полного растворения. Цилиндром вместимостью 25 см^3 отмеряют 20,0 см^3 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 см^3 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 — 6 мес.

9.4.3 Приготовление основных растворов микотоксинов

По 1 мг кристаллических микотоксинов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см^3 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 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 год.

9.4.4 Приготовление вспомогательных растворов микотоксинов

Вспомогательные растворы микотоксинов хранят в холодильнике во флаконах вместимостью 2 см^3, 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 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 (см. 9.4.1), плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,00001 мг/ $см^3$ (0,01 мкг/$см^3$).

9.4.4.2 Приготовление 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 (см. 9.4.1), плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,00002 мг/ $см^3$ (0,02 мкг/$см^3$).

9.4.4.3 Приготовление 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 (см. 9.4.1), плотно закрывают их крышками, тщательно перемешивают раствор и наносят на флаконы маркировку. Концентрации вспомогательных растворов составляют 0,0001 мг/ $см^3$ (0,1 мкг/$см^3$).

9.4.4.4 Приготовление 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 (см. 9.4.1), плотно закрывают его крышкой, тщательно перемешивают раствор и наносят на флакон маркировку. Концентрация вспомогательного раствора составляет 0,001 мг/ $см^3$ (1,0 мкг/$см^3$).

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 масштабно-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/$см^3$; на оси ординат — девять разграничительных меток на расстоянии 10 мм друг от друга с цифровыми обозначениями от 10 до 90 и общее обозначение оси — $ОП/ОП_0 \times 100$, %.

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 $см^3$ 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.

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 $см^3$ 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.

9.6.4 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.

9.7 Экстракция

Навески проб массой 10 г помещают в конические колбы вместимостью 100 $см^3$. Цилиндром вместимостью 100 $см^3$ отмеряют и добавляют к навескам грубых кормов (сено, солома) по 100 $см^3$ смеси ацетонитрила и воды (см. 9.4.2), к навескам всех остальных кормов — по 50 $см^3$ 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 $см^3$ воды, переливают в пробирку, добавляют 1,0 $см^3$ реактива БУФЕР-Р2, перемешивают, наносят маркировку Р2.

10.2 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.

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 $см^3$ раствора Р2 и вливают его в пробирку. Дозатором отмеряют 0,15 $см^3$ 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 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.

10.4.2 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 10.4, 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)

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

10.6 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.

10.7 Приготовление и внесение в ячейки рабочих растворов реактива АТ

10.7.1 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.

10.7.2 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.

10.8 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.

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 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.

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 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.

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 см^3 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 мкг/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, 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.

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

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

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.

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

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

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

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

где $S_{I(TOE)отн}$ — 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 производятся 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	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		$ОП/ОП_0 \times 100$, %	lg C	C
	по ячейкам	среднее			
К0		$ОП_0$	100	—	—
К1					
К2					
К3					
…					

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.а

[8] ТУ 9398-007-42442516—2002 Тест-система для иммуноферментного определения афлатоксина B_1 «Афлатоксин B_1-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 B_1 «Фумонизин B_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 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.
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