ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА
(ФБУЗ «ФЦГиЭ Роспотребнадзора»)

Юридический адрес: Варшавское шоссе, 19 А, Москва, 117105

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.310430

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики (метода) измерений
№ 0339/РОСС RU.0001.310430/2023

Методика (метод) измерений Методика измерений массовой доли домоевой кислоты, окадаиковой кислоты и сакситоксина в морепродуктах методом иммуноферментного анализа
(наименование измеряемой величины, объекта)

Разработанная ОДО "КомПродСервис"
(наименование юридического лица, разработавшего МИ, адрес)

Беларусь, г. Минск, ул. Филимонова, 25 «Г», пом. 1000

и регламентированная в МИ К003-2023 «Методика измерений массовой доли домоевой кислоты, окадаиковой кислоты и сакситоксина в морепродуктах методом иммуноферментного анализа», 2023 г.
(обозначение и наименование документа, год утверждения)

аттестована в соответствии с Приказом Минпромторга России от 15 декабря 2015 г. № 4091, ГОСТ Р 8.563-2009
Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по разработке МИ
(вид работ: метрологическая экспертиза материалов по разработке МИ, теоретическое или экспериментальное исследование МИ, другие виды работ)

В результате аттестации МИ установлено, что МИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками, приведенными в приложении.

Документ на МИ содержит 17 страниц

Приложение: метрологические характеристики методики измерений в 1 экземпляре на 1 листе.

Главный врач Р.К. Фридман

Дата выдачи: «11» декабря 2023 г.

Приложение к свидетельству №0339/РОСС RU.0001.310430/2023

об аттестации методики (метода) измерений: «Методика измерений массовой доли домоевой кислоты, окадаиковой кислоты и сакситоксина в морепродуктах методом иммуноферментного анализа»

Таблица 1. Метрологические характеристики

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности) ±δ, % P=0,95	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R, %, (P=0,95)
Фикотоксин						
Домоевая кислота	0,15 – 0,8	30	4,3	12,0	24	34
Окадаиковая кислота	0,05-2	35	4,8	6,7	13	19
Сакситоксин	0,004–0,09	40	6,4	8,9	18	25

Главный метролог Дударев М.М.

ОДО «КомПродСервис»

УТВЕРЖДАЮ
Директор
ОДО «КомПродСервис»

_____ Д.Ч. Кучинский

« 04 » декабря 2023 г.
М.П.

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ ДОЛИ ДОМОЕВОЙ КИСЛОТЫ, ОКАДАИКОВОЙ КИСЛОТЫ И САКСИТОКСИНА В МОРЕПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

МИ К003-2023

Москва 2023

Методика измерения массовой доли домоевой кислоты, окадаиковой кислоты и сакситоксина в морепродуктах методом иммуноферментного анализа. МИ. – .

1. Разработана Общество с дополнительной ответственностью «КомПродСервис» (ОДО «КомПродСервис») (Д.Ч. Кучинский, С.В. Ткачев).

2. Утверждена Директором ОДО «КомПродСервис» от «04» декабря 2023 г.

3. Введена впервые.

4. Аттестована в соответствии с Приказом Минпромторга России от 15 декабря 2015 г. №4091, ГОСТ Р 8.563-2009 Федеральным бюджетным учреждением здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (ФБУЗ «ФЦГиЭ Роспотребнадзора»)

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.310430

Свидетельство об аттестации методики измерений № 0339/РОСС RU.0001.310430/2023

5. Сведения о регистрации

Регистрационный номер в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений ФР.1.31.2023.47317.

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее – МИ) массовой доли домоевой кислоты, окадаиковой кислоты, сакситоксина в мясе моллюсков методом иммуноферментного анализа. Диапазоны измерений: домоевая кислота – 0,15–0,8 мг/кг; окадаиковая кислота – 0,05–2 мг/кг; сакситоксин – 0,004–0,09 мг/кг.

1.2. МИ носит рекомендательный характер.

II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

2.1. Домоевая кислота – нейротоксин, вызывающий амнезию при отравлении моллюсками; является гетероциклической непротеиногенной аминокислотой, структурный аналог каиновой кислоты и пролина. Чистая домовая кислота имеет вид бесцветных кристаллических игл, растворима в воде, разбавленных минеральных кислотах и растворах щелочей, слабо растворима в метаноле и этаноле, нерастворима в петролейном эфире и бензоле.

2.2. Окадаиковая кислота – токсин, мощный ингибитор специфических белковых фосфатаз. Является поликетидом, полиэфирным производным жирных кислот. Визуально – полупрозрачные кристаллы со слоистой структурой. Окадаиковая кислота растворима в этаноле, ДМСО, метаноле, хлороформе, ацетоне, этилацетате, ДМФ. Нерастворима в воде.

2.3. Сакситоксин – нейротоксин, при попадании в организм человека, как правило, при употреблении моллюсков, загрязненных токсичными водорослями, вызывает паралич мускулатуры, в том числе дыхательной. Химически сакситоксин представляет собой тетрагидропурин; дигидрохлорид сакситоксина – аморфное гигроскопичное вещество растворимое в воде.

III. ПОГРЕШНОСТЬ ИЗМЕРЕНИЙ

3.1. При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и её составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности p = 0,95 не превышает значений, приведенных в таблице 3.1 для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 3.1

Метрологические характеристики

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, P=0,95), ±δ, %	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), *r*, %	Предел воспроизводи-мости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R, %, (P=0,95)
Фикотоксин						
Домоевая кислота	0,15 – 0,8	30	4,3	12,0	24	34
Окадаиковая кислота	0,05-2	35	4,8	6,7	13	19
Сакситоксин	0,004–0,09	40	6,4	8,9	18	25

IV. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ

4.1. Метод измерений основан на принципах конкурентного ИФА. При внесении в лунки иммунологического планшета, сенсибилизированного антителами к кроличьим иммуноглобулинам, градуировочных растворов, опытных проб, а также растворов антител (кроличьи поликлональные иммуноглобулины к определенному фикотоксину) и конъюгата (фикотоксин, связанный с пероксидазой хрена), фикотоксины, содержащиеся в конъюгате, пробах и градуировочных растворах специфически связываются с кроличьими иммуноглобинами, а те, в свою очередь, связываются с твердой фазой. Все не вступившие в иммунохимическую реакцию вещества удаляются промывкой лунок специальным буферным раствором. На следующей стадии ИФА в промытые лунки вносится хромоген-субстратный раствор, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Пероксидаза конъюгата катализирует реакцию перекисного окисления ТМБ. Далее, вносится стоп-реагент, который останавливает реакцию, меняет цвет и фиксирует интенсивность окрашивания раствора в лунке. Чем больше фикотоксина присутствует в лунке, тем ниже оптическая плотность раствора (далее – ОП), измеряемая на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Интенсивность цветной реакции обратно пропорциональна количеству фикотоксина в пробе. Массовая концентрация фикотоксина в пробе определяется по калибровочной кривой, учитывая фактор разведения пробы.

Коэффициенты перекрестно-реагирующих производных соединений (перекрестной чувствительности) указаны в таблице 4.1.

Таблица 4.1

Коэффициенты чувствительности перекрестно-реагирующих производных соединений

Определяемый фикотоксин	Перекрестно реагирующие производные соединения	Коэффициенты чувствительности, %
1	2	3
Сакситоксин	Сакситоксин	100
	Декарбомоил сакситоксина	19,2
	Гоньятоксин GTX 2/3	5,6
	Гоньятоксин GTX 5	26,2
	Decarbamoyl GTX 2/3	0,2
	Неосакситоксин	1,4
	Дакарбамоил неосакситоксина	0,5
	Гоньятоксин GTX 1/4	0,1
Домоевая кислота	Домоевая кислота	100
	Окадаиковая кислота	<0,1
	DTX-1 и DTX-2	<0,1
	Сакситоксин	<0,1
	Неосакситоксин	<0,1
	Гоньятоксин GTX 2/3, 1/4	<0,1
Окадаиковая кислота	Окадаиковая кислота	100
	Динофизистоксин DTX-1	8
	Динофизистоксин DTX-1	3
	Сакситоксин, неосакситоксин, домоевая кислота, гоньятоксины	0

V. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

5.1. При выполнении измерений и подготовке проб применяют средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы, состав тест-систем приведенные в таблицах 5.1-5.6.

Таблица 5.1

Средства измерений

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Фотометр микропланшетный	Измерения при длине волны 450 нм в диапазоне от 0 до 2,5 Б, с относительной погрешностью измерения оптической плотности не более 5 %.
Весы	Неавтоматического действия I (специального) или II (высокого) класса точности по ГОСТ Р 53228, с максимальной нагрузкой 400 г, дискретностью не более 0,1 г
Колбы мерные	Вместимостью 50, 100 и 200 см^3 типа 2-(50, 100, 200)-2 по ГОСТ 1770
Цилиндр мерный	Вместимостью 100 и 250 см^3 типа 2-(100, 250)-2 по ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ OIML R 111-1
Дозаторы (пипетки) автоматические или механические одноканальные и 8-канальные	Диапазон измерений 10-100 100-1000 1000-5000, 50-300 мм^3 с допускаемым относительным СКО не более 5,0 % по ГОСТ 28311.
Пипетки градуированные	Вместимостью 1, 5 и 10 см^3 типа 1-1(2)-2-1, 1-1(2)-2-5, 1-1(2)-2-10 по ГОСТ 29227
Прибор/приборы для измерения температуры и относительной влажности воздуха	Прибор комбинированный (термогигрометр) Testo-608-H1; температура (0-50)±0,5°С; относительная влажность (15-85) ±3%
Примечание: допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.	

Таблица 5.2

Реактивы

Наименование реактивов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Окадиковая кислота	Содержание основного компонента не менее 95 %
Сакситоксин	Содержание основного компонента не менее 95 %
Домоевая кислота	Содержание основного компонента не менее 95 %
Калий бихромат	Первый сорт по ГОСТ 2652
Метанол	ч.д.а по ГОСТ 6995
3-Водный уксуснокислый натрий	ч.д.а по ГОСТ 199
Вода дистиллированная	По ГОСТ Р 58144
Кислота серная концентрированная	ч. или ч.д.а. по ГОСТ 4204
Примечание: допускается использование растворителей, не требующих дополнительной очистки, реактивов с более высокой квалификацией и стандартных референс материалов.	

Таблица 5.3

Вспомогательные устройства, материалы

Наименование вспомогательного оборудования, устройств, материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Лабораторный гомогенизатор или бытовой погружной блендер	-
Шейкер вихревой для пробирок (типа вортекс)	Скорость оборотов не менее 100 об/мин
Центрифуга	Частота вращения ротора не менее 3000 g
Холодильник	Бытовой электрический
Стаканы химические	Вместимостью 50, 100, 250 $см^3$ по ГОСТ 25336
Пробирки полипропиленовые центрифужные	Вместимостью 15 $см^3$
Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 2 $см^3$	Вместимостью не более 2 $см^3$
Наконечники одноразовые	Вместимость 5-5000 $мм^3$
Шприц-фильтр или шприц и фильтрующая насадка на шприц диаметром 15 мм и диаметром пор 0,45 мкм на основе целлюлозы	Диаметр фильтра 15 мм, диаметр пор 0,45 мкм
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026
Шпатели или палочки стеклянные	-
Примечание: допускается использование вспомогательных средств измерений, устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.	

Таблица 5.4

Состав тест-системы для количественного определения сакситоксина
Тест-система для обнаружения Сакситоксина методом ELISA, EuroProxima, Нидерланды

№ п/п	Наименование компонентов набора	Количество
1	Иммунологический планшет, покрытый антителами к кроличьим антителам	1 планшет, состоящий 12 стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок)
2	Буфер для разведения (10-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 30 $см^3$
3	Буфер для промывки (20-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 30 $см^3$
4	Хромоген-субстратный раствор	1 флакон объемом не менее 12 $см^3$
5	Стоп-реагент	1 флакон объемом не менее 6 $см^3$
6	Конъюгат, (сакситоксин, меченный пероксидазой, лиофилизат)	1 флакон объемом не менее 4,0 $см^3$
7	Антитела (кроличьи антитела специфичные к сакситоксину, 100-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 0,7 $см^3$
8	Нулевой градуировочный раствор	1 флакон объемом не менее 2 $см^3$
9	Градуировочные растворы с известными массовыми концентрациями сакситоксина равными 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 нг/$см^3$	6 флаконов объемом не менее 1 $см^3$
Примечание: использование других тест-систем не допускается.		

Таблица 5.5

Состав тест-системы для количественного определения домоевой кислоты
Тест-система для обнаружения Домоевой кислоты методом ELISA, EuroProxima, Нидерланды

№ п/п	Наименование компонентов набора	Количество
1	Иммунологический планшет, покрытый антителами к кроличьим антителам	1 планшет, состоящий 12 стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок)
2	Буфер для разведения (10-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 30 $см^3$
3	Буфер для промывки (20-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 10 $см^3$
4	Хромоген-субстратный раствор	1 флакон объемом не менее 12 $см^3$
5	Стоп-реагент	1 флакон объемом не менее 15 $см^3$
6	Конъюгат, (домоевая кислота, меченная пероксидазой, 100-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 0,7 $см^3$
7	Антитела (кроличьи антитела специфичные к домоевой кислоте, лиофилизат)	1 флакон объемом не менее 4 $см^3$
8	Нулевой градуировочный раствор	1 флакон объемом не менее 2 $см^3$
9	Градуировочные растворы с известными массовыми концентрациями домоевой кислоты равными 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 нг/$см^3$	6 флаконов объемом не менее 1 $см^3$
Примечание: использование других тест-систем не допускается.		

Таблица 5.6

Состав тест-системы для количественного определения окадаиковой кислоты
Тест-система для обнаружения Окадаиковой кислоты методом ELISA, EuroProxima, Нидерланды

№ п/п	Наименование компонентов набора	Количество
1	Иммунологический планшет, покрытый антителами к кроличьим антителам	1 планшет, состоящий 12 стрипов по 8 лунок (всего 96 лунок)
2	Буфер для разведения (10-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 30 $см^3$
3	Буфер для промывки (20-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 30 $см^3$
4	Хромоген-субстратный раствор	1 флакон объемом не менее 12 $см^3$
5	Стоп-реагент	1 флакон объемом не менее 15 $см^3$
6	Конъюгат, (окадаиковая кислота, меченная пероксидазой, 100-кратный концентрат)	1 флакон объемом не менее 0,7 $см^3$
7	Антитела (кроличьи антитела специфичные к окадаиковой кислоте, лиофилизат)	1 флакон объемом не менее 4 $см^3$
8	Нулевой градуировочный раствор	1 флакон объемом не менее 2 $см^3$
9	Градуировочные растворы с известными массовыми концентрациями окадаиковой кислоты равными 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 нг/$см^3$	6 флаконов объемом не менее 1 $см^3$
Примечание: использование других тест-систем не допускается.		

VI. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

6.1. При выполнении измерений соблюдают требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на фотометр микропланшетный.

6.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004.

6.3. Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист, имеющий опыт работы на фотометре микропланшетном, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментальное соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

6.4. При работе с тест-системами:

- не допускают попадания стоп-реагента на кожу и слизистые (стоп-реагент содержит 0,5 М раствор серной кислоты);
- хромоген-субстратный раствор токсичен при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании, при обращении соблюдают меры предосторожности.

VII. УСЛОВИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

7.1. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха плюс (20 – 25) ^{0}С и относительной влажности не более 80 %;

- выполнение измерений на фотометре микропланшетном проводят в условиях, рекомендованных технической документацией на прибор.

VIII. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

8.1. Измерениям предшествуют следующие операции: подготовка тест-систем и реагентов, подготовка растворов, подготовка экстрактов проб, подготовка посуды стеклянной.

8.2. Подготовка тест-систем и реагентов

8.2.1 Перед проведением измерений все реагенты тест-систем (включая необходимое число стрипов) доводят до комнатной температуры плюс (20 – 25) °С в течение 30-60 минут.

8.2.2. Подготовка иммунологического планшета

Вскрывают пакет с планшетом и устанавливают на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы хранят в плотно закрытом фольгированном пакете при температуре плюс (2 – 8) °С.

8.2.3. Подготовка растворов

8.2.3.1. Приготовление рабочего раствора буфера для промывки (из концентрата). Раствор готовят путём разбавления концентрата промывочного раствора дистиллированной водой в соотношении, указанном в инструкции к применяемой тест-системе. В случае образования кристаллов, их растворяют путём встряхивания при температуре плюс (20 – 25) °С. Готовый рабочий раствор промывочного буфера хранят в холодильнике при температуре плюс (2 – 8) °С не более 6 недель.

8.2.3.2. Приготовление рабочего раствора буфера для разведения (из концентрата). Перед приготовлением рабочего раствора концентрат буфера для разведения необходимо нагреть до температуры плюс (20 – 25) °С. Рабочий раствор буфера для разведения должен готовиться непосредственно перед использованием. Для его приготовления в стакане вместимостью 100 см^3 смешивают 10 см^3 концентрированного буфера и 90 см^3 дистиллированной воды. В случае, образования кристаллов, их растворяют путём встряхивания при температуре плюс (20 – 25) °С.

8.2.3.3. Приготовление рабочего раствора для разведения проб для определения окадаиковой кислоты. Раствор для разведения проб должен готовиться непосредственно перед использованием. Для его приготовления в стакане вместимостью 50 см^3 смешивают 9,2 см^3 рабочего раствора буфера для разведения и 0,8 см^3 100% метанола, полученный раствор интенсивно перемешивают.

8.2.3.4. Приготовление рабочего раствора антител для определения домоевой и окадаиковой кислоты. Для восстановления антител во флакон с лиофилизатом добавляют 4 см^3 рабочего раствора буфера для разведения, раствор тщательно перемешивают. Неиспользованный раствор хранят в холодильнике при температуре плюс (2 – 8) °С в течение всего срока годности тест-системы.

8.2.3.5. Приготовление рабочего раствора антител для определения сакситоксина. Для приготовления рабочего раствора антител необходимо отцентрифугировать флакон с концентратом в течение 1 минуты при 1000g при температуре плюс (20 – 25) °С. Концентрированный раствор антител разводят буфером для разведения в соотношении 1:100 (например, 5 мм^3 концентрата антител разводят 495 мм^3 буфера для разведения), разведение проводят в микроцентрифужных пробирках (типа Эппендорф) вместимостью 2 см^3. Неиспользованный раствор хранят в холодильнике при температуре плюс (2 – 8) °С в течение всего срока годности тест-системы.

8.2.3.6. Приготовление рабочего раствора конъюгата тест-систем для определения домоевой и окадаиковой кислоты. Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимо отцентрифугировать флакон с концентратом в течение 1 минуты при 1000g при температуре плюс (20 – 25) °С. Концентрированный раствор конъюгата разводят рабочим раствором рабочим раствором буфера для разведения в соотношении 1:100 (например, 5 мм^3 концентрата конъюгата разводят 495 мм^3 буфера для разведения). Неиспользованный раствор должен храниться в темном месте при температуре от плюс (2 – 8) °С не более 7 дней, для более длительного хранения восстановленный конъюгат необходимо разлить на аликвоты и хранить их при температуре от минус (18 – 20) °С.

8.2.3.7. Приготовление рабочего раствора конъюгата тест-системы для определения сакситоксина. Для восстановления конъюгата во флакон с лиофилизатом добавляют 4 см^3 рабочего раствора буфера для разведения, раствор тщательно перемешивают. Неиспользованный раствор должен храниться в темном месте при температуре от плюс (2 – 8) °С не более 7 дней, для более длительного хранения восстановленный конъюгат необходимо разлить на аликвоты и хранить их при температуре минус (18 – 20) °С.

8.2.3.8. Приготовление 0,2 М раствора уксуснокислого натрия. Навеску безводного ацетата натрия массой 3,28 г переносят в мерную колбу вместимостью 200 см^3, добавляют дистиллированную воду и после растворения ацетата натрия доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Готовый раствор хранят в полиэтиленовой, полипропиленовой или резиновой таре при комнатной температуре не более 2 недель.

Примечания — Принимается допущение, что плотность растворов (солей, кислот и щелочей), используемых в настоящей методике, а также растворов (суспензий) исследуемых проб приравнивается к плотности воды, исходя из чего при приготовлении последующих разведений, следует учитывать, что массовые (м/м) и объемные (о/о) проценты принимаются равными.

8.3. Подготовка экстрактов проб

8.3.1. Подготовка экстрактов проб к анализу домоевой и окадаиковой кислот

8.3.1.1. Отобранные пробы мяса моллюсков доводят до однородной консистенции в гомогенизаторе (пробы с плотной консистенцией предварительно измельчают ножницами).

8.3.1.2 В пробирку вместимостью 15 см^3 помещают 1 г подготовленной пробы по 8.3.1.1, в пробирку вносят 1,0 см^3 дистиллированной воды, содержимое пробирки перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

8.3.1.3. В пробу, подготовленную по 8.4.1.2, вносят 2 см^3 100% метанола, содержимое пробирки перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют в течение 10 мин при 2000 g и температуре плюс (20 – 25) °С.

8.3.1.4. Из пробы, подготовленной по 8.3.1.3, отбирают супернатант, фильтруют его через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

8.3.1.5. При определении домоевой кислоты разводят супернатант, полученный по 8.3.1.4, рабочим раствором буфера для разведения, приготовленным по 8.2.3.2, в пропорции 1:100. Например, к 990 мм^3 рабочего раствора буфера для разведения добавляют 10 мм^3 супернататнта, затем раствор тщательно перемешивают вручную или на вортексе.

Разведенный экстракт по 8.3.1.5 используют в анализе для диапазона определяемой массовой концентрации домоевой кислоты от 0,15 до 0,8 мг/кг включительно. Фактор разведения (F) равен 400.

8.3.1.6. При определении окадаиковой кислоты разводят супернатант, полученный по 8.3.1.4, буфером для разведения, приготовленным по 8.2.3.3, в пропорции 1:50. Например, к 490 мм^3 буфера для разведения добавляют 10 мм^3 супернататнта, затем раствор тщательно перемешивают вручную или на вортексе.

Разведенный экстракт по 8.3.1.6 используют в анализе для диапазона определяемой массовой концентрации окадаиковой кислоты от 0,05 до 2 мг/кг включ. Фактор разведения (F) равен 200.

8.3.2. Подготовка экстрактов проб к анализу сакситоксина.

8.3.2.1. Отобранные пробы мяса моллюсков доводят до однородной консистенции в гомогенизаторе (пробы с плотной консистенцией предварительно измельчают ножницами).

8.3.2.2 В пробирку вместимостью 15 см^3 помещают 1 г подготовленной пробы по 8.3.2.1, в пробирку вносят 5,0 см^3 0,2 М раствора уксуснокислого натрия, приготовленного по 8.2.3.8, содержимое пробирки перемешивают на вортексе в течение 1 мин, затем центрифугируют в течение 10 мин при 3000 g и температуре плюс (20 – 25) °С.

8.3.2.3. Из пробы, подготовленной по 8.3.2.2, отбирают супернатант, который фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

8.3.2.4 Супернатант, полученный по 8.3.2.3, разводят раствором для разведения проб, приготовленным по 8.2.3.2 в пропорции 1:50. Например, к 490 мм^3 раствора для разведения проб добавляют 10 мм^3 супернатанта, затем раствор тщательно перемешивают вручную.

Разведенный экстракт по 8.3.2.4 используют в анализе для диапазона определяемой массовой концентрации сакситоксина от 0,004 до 0,09 мг/кг включ. Фактор разведения (F) равен 300.

8.5. Подготовка посуды стеклянной

Сильнозагрязненную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью, промывают и ополаскивают дистиллированной водой.

IX. ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

9.1. Отбор проб моллюсков осуществляют в соответствии с ГОСТ 31339, либо иной действующей нормативной и (или) технической документацией по отбору проб. Пробы доставляются в лабораторию сразу после их отбора.

X. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

10.1 Требования к выполнению измерений

10.1.1. Условия хранения и использования тест-систем. Тест-системы должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя в холодильнике при температуре плюс (2 – 8)°С в течение срока годности, указанного на упаковке набора. Допускается хранение (транспортирование) тест-систем при температуре не выше плюс 25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание тест-систем. В случае дробного использования тест-системы компоненты после вскрытия флаконов последующей укупорки хранят при температуре плюс (2 – 8)°С в течение срока годности.

10.1.2. Недопустимо смешивать, заменять и использовать в одной постановке реагенты из тест-наборов с разными номерами партии.

10.1.3 Перед использованием встряхивают каждый флакон с реагентом.

10.1.4. После использования реагенты сразу убирают в холодильник.

10.1.5. Для всех реагентов используют отдельные съемные наконечники для дозаторов. Внесение растворов в лунки проводят не касаясь наконечниками их дна и стенок.

10.1.6. При проведении анализа избегают попадания пузырьков воздуха в лунки. Перед считыванием результатов на фотометре убедитесь в отсутствии пузырьков в лунках, т.к. это может повлиять на результат считывания оптической плотности.

10.1.7. Во время анализа избегают воздействия прямого солнечного света на лунки планшета и на светочувствительный хромоген субстратный раствор.

10.1.8. Не позволяют лункам высыхать между этапами анализа во избежание ложных результатов, сразу же приступают к следующему этапу после промывания лунок.

10.1.9. Уделяют особое внимание правильной промывке лунок между стадиями, так как это может влиять на воспроизводимость результатов. Промывка может проводиться как вручную, так и с использованием автоматических устройств. Вносят 300 мм^3 промывочного раствора в лунку при каждой отмывке. Задержка при отмывке («замачивание») не требуется. После окончания ручной отмывки опрокидывают планшет на фильтровальную бумагу для удаления остатков промывочного раствора.

10.1.10. Не допускают окрашивание раствора хромоген субстратного раствора в голубоватый цвет до проведения реакции.

10.1.11. После остановки реакции с раствором хромоген субстратного раствора измеряют оптическую плотность в течение не более 5 минут.

10.1.12. Результаты считают недействительными, если оптическая плотность нулевого градуировочного раствора при определении сакситоксина, домоевой кислоты и окадаиковой кислоты менее 0,8 единиц ОП.

10.2. Порядок выполнения измерений

10.2.2. Калибровка и измерение проводятся одновременно в рамках проведения одной серии анализов.

10.2.3. В рамку планшета, подготовленного по 8.2.2, помещают необходимое для проведения измерений количество стрипов из расчета: 2 лунки для холостой пробы (нулевой градуировочный раствор), 14 лунок для калибровочных проб и необходимое количество лунок для исследуемых проб с учетом проведения двух параллельных определений (максимальное количество исследуемых проб в двух параллелях – 80). Записывают

положение лунок с градуировочными и исследуемыми пробами на бланке планшета.

10.2.4. Вносят в лунки Н1 и Н2 по 100 мм^3 холостой пробы (нулевого градуировочного раствора), вносят в лунки А1 и А2 по 50 мм^3 нулевого градуировочного раствора, вносят в лунки от В1,2 до G1,2 по 50 мм^3 градуировочных растворов с увеличивающимися концентрациями фикотоксинов. В пары лунок, предназначенных для исследуемых проб, вносят по 50 мм^3 экстрактов проб, подготовленных по 8.3. Во все лунки, за исключением Н1 и Н2, вносят по 25 мм^3 рабочего раствора конъюгата.

10.2.5. Во все лунки, за исключением Н1 и Н2, вносят по 25 мм^3 рабочего раствора антител.

Внесение холостой, калибровочных, и исследуемых проб, а также растворов антител и конъюгата должно занимать не более 5-6 минут.

10.2.6. Закрывают планшет (например, парафильмом или крышкой), аккуратными круговыми движениями в течение 1 мин перемешивают его содержимое, далее планшет инкубируют в течение 30 минут при температуре плюс (20 – 25) °С без доступа света и без встряхивания.

10.2.7. По окончании инкубации по 10.2.6 удаляют содержимое из лунок планшета, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем трехкратного интенсивного простукивания рамки по горизонтальной поверхности стола, накрытого фильтровальной бумагой.

10.2.8. Во все лунки планшета вносят по 300 мм^3 рабочего раствора промывочного буфера, подготовленного по 8.2.3.1, с помощью 8-канального дозатора (пипетки). Процедуру промывки проводят 3 раза. При каждой отмывке добавляют во все лунки по 300 мм^3 рабочего раствора промывочного буфера, удаляют содержимое из лунок планшета, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем трехкратного интенсивного простукивания рамки по горизонтальной поверхности стола, накрытого фильтровальной бумагой.

10.2.9. В каждую лунку планшета добавляют 100 мм^3 хромоген субстратного раствора и инкубируют планшет в течение 15 минут при комнатной температуре плюс (18 – 25 °С) без прямого доступа света и без встряхивания.

10.2.10. По окончании инкубации по 10.2.9 в каждую лунку планшета вносят 100 мм^3 стоп-реагента, при этом содержимое лунок планшета окрашивается в ярко-желтый цвет, затем перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой.

10.2.11. На спектрофотометре при длине волны 450 нм проводят измерения ОП содержимого лунок. Измеряйте оптическую плотность в течение не более 5 минут после внесения стоп-реагента.

XI. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

11.1. Результат определений массовой концентрации фикотоксина рассчитывают следующим образом.

По результатам двух параллельных определений вычисляют средние арифметические значения оптических плотностей, полученных для холостой пробы ($\bar{b}_{\text{ХП}}$) по формуле

$$\bar{b}_{\text{ХП}} = \frac{\bar{b}_{\text{ХП}_1} + \bar{b}_{\text{ХП}_2}}{2} \quad (1)$$

Затем, рассчитывают значения оптических плотностей калибровочных (B_i) и

исследуемых проб ($B_{\text{проба}}$), с учетом холостой пробы по формулам:

$$b_i - \bar{b}_{\text{ХП}} = B_i$$
$$b_{\text{проба}} - \bar{b}_{\text{ХП}} = B_{\text{проба}} \quad (2)$$

На основании рассчитанных B_i для градуировочных проб строят градуировочный график и рассчитывают его параметры. Градуировочная зависимость имеет вид

$$y = a - b \cdot x \quad (3)$$

где

$y = \frac{B_i}{B_0} \times 100\%$;

$x = lg\, C_i$;

a, b – коэффициенты линейной регрессии, рассчитываемые методом наименьших квадратов на основании $\bar{B}_i$ и C_i, полученных для семи градуировочных растворов при i = 1...7;

B_i– оптическая плотность *i*-ого градуировочного раствора;

B_0 – оптическая плотность градуировочного раствора с массовой долей фикотоксина 0 нг/см^3;

C_i – массовая доля фикотоксина в *i*-ом градуировочном растворе (нг/см^3).

Массовую долю анализируемого фикотоксина в пробах рассчитывают на основании результатов измерений оптической плотности раствора исследуемой пробы (2) и (3), коэффициентов линейной регрессии и фактора разведения по формулам

$$ln\, W = \frac{a - \left(\frac{B_{\text{проба}}}{B_0} \times 100\%\right)}{b} \quad (4)$$

$$W = e^{ln\, W} \cdot F \cdot 0{,}001 \quad (5)$$

где W – массовая доля анализируемого фикотоксина в исследуемой пробе, мг/кг;

F – фактор разведения при приготовлении экстрактов проб по п. 8.3;

0,001 – коэффициент пересчета нг/см^3 в мг/кг.

Примечания — Для расчета результатов измерений используют специализированный шаблон таблиц в формате Microsoft Excel, рекомендованный изготовителем тест-набора или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра или компьютерная программа RIDASOFT Win.NET Food & Feed (R-Biopharm, Германия).

11.2. За результат измерений массовой концентрации фикотоксина в исследуемой пробе ($\overline{W}$, мг/кг) принимают среднее арифметическое значение двух результатов параллельных определений по (5)

$$\overline{W} = \frac{W_1 + W_2}{2}, \quad (6)$$

при выполнении условия (7)

$$\frac{2 \times |W_1 - W_2| \times 100}{W_1 + W_2} \leq r_0 \quad (7)$$

где W_1, W_2 – результаты двух параллельных определений массовой концентрации фикотоксина в исследуемой пробе, мг/кг.

r_0 - значение предела повторяемости по таблице 3.1, %.

XII. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

12.1. Результат количественного анализа представляют в виде:

$$(X \pm \Delta) \text{ мг/кг}, \quad (8)$$

где X - результат определения, мг/кг.

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг

$$\Delta = \delta \cdot X/100, \quad (9)$$

где δ - граница относительной погрешности методики (показатель точности по диапазону концентраций, (таблица 3.1), %.

Если содержание фикотоксина менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде: «содержание сакситоксина в пробах – менее 0,004 мг/кг; содержание домоевой кислоты в пробах – менее 0,15 мг/кг; содержание окадаиковой кислоты в пробах – менее 0,05 мг/кг»[1].

XIII. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

13.1. Контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6) «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений». Периодичность и формы контроля определяется руководством по качеству.

---

[1] 0,004 мг/кг - предел обнаружения сакситоксина в мясе моллюсков; 0,15 мг/кг – предел обнаружения домоевой кислоты в мясе моллюсков; 0,05 мг/кг – предел обнаружения окадаиковой кислоты в мясе моллюсков.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2. ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6) «Межгосударственный стандарт. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений», введенный постановлением Госстандарта России от 23.04.2002 г № 161-ст.

3. ГОСТ 12.1.004 «Межгосударственный стандарт. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная безопасность. Общие требования», введенный Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 14.06.1991 г № 875.

4. ГОСТ 12.1.007 «Межгосударственный стандарт. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности», введенный Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 10.03.1976 г № 579.

5. ГОСТ 12.1.019 «Межгосударственный стандарт. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты», приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 07.11.2018 г № 941-ст введен в действие в качестве национального стандарта Российской федерации с 01.01.2019 г.

6. ГОСТ 12.4.009 «Межгосударственный стандарт. Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание», введенный Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 10.10.1983 г № 4882.

7. ГОСТ 1770 «Межгосударственный стандарт. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия», введенный Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 18.11.1974 г № 2547.

8. ГОСТ 4328 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия», утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 17.06.77 г. № 1514.

9. ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия», утвержден Комитетом стандартов, мер и измерительных приборов при Совете Министров СССР 4 мая 1966 г. Срок введения установлен с 01.07.67 г.

10. ГОСТ 25336 «Межгосударственный стандарт. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры», утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 15.07.82 № 2670.

11. ГОСТ 28311 «Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний», введённый приказом Росстандарта от 12.10.2021 № 1128-ст.

12. ГОСТ 29227 «Межгосударственный стандарт. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования», введенный Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.12.1991 № 2234.

13. ГОСТ 31339-2006 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб», введенный Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2006 г № 501-ст.

14. ГОСТ Р 53228 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания», введенный Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25.12.2008 г № 739-ст.

15. ГОСТ Р 58144 «Вода дистиллированная. Технические условия», введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 мая 2018 г № 280-ст.

16. ГОСТ OIML R 76-1 «Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания», введен приказом Росстандарта от 22.12.2011 г № 1579-ст.

17. РМГ 61 «Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки». Утвержден: приказом Росстандарта от 13.12.2011 г № 1064-ст.

18. РМГ 76 «Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа». Утвержден приказом Росстандарта от 09.07.2014 № г 778-ст.