

**ОДО «КомПродСервис»**

**Утверждаю**

**Директор ОДО «КомПродСервис»**



**Д. Ч. Кучинский**  
**«15» января 2024 г.**

**Методика измерений массовой доли суммы афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в пищевой продукции и кормах методом иммуноферментного анализа**

**г. Минск**  
**2024**

## Содержание

Содержание.....	1
1. Назначение и область применения.....	2
2. Нормативные ссылки.....	2
3. Требования к показателям точности измерений.....	2
4. Оборудование и материалы.....	3
4.1 При работе с набором следует использовать следующие средства измерений, оборудование и материалы.....	3
4.2 Реактивы, используемые в работе.....	4
5. Метод измерений.....	5
6. Общие требования.....	5
7. Требования безопасности, охраны окружающей среды.....	6
8. Требования к квалификации операторов.....	7
9. Требования к условиям измерений.....	7
10. Подготовка к выполнению измерений.....	7
10.1 Отбор и правила хранения проб.....	7
10.2 Подготовка средств измерений.....	7
10.3 Подготовка тест-набора, растворов и реагентов.....	7
10.5 Подготовка проб.....	9
11. Порядок выполнения измерений.....	10
12. Обработка результатов измерений.....	11
13. Оформление результатов.....	14
14. Контроль качества результатов.....	14

## 1. Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой доли микотоксинов суммы афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в пищевой продукции и кормах методом иммуноферментного анализа в диапазоне измерений массовой доли 2,0 – 60,0 мкг/кг с использованием тест-системы ПРОДОСКРИН® ИФА-СУММА АФЛАТОКСИНОВ.

Настоящая методика измерений предназначена для применения в испытательных лабораториях, занимающихся контролем безопасности пищевой продукции и продовольственного сырья.

## 2. Нормативные ссылки

РМГ 61-2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки.

СТБ ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения.

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

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

## 3. Требования к показателям точности измерений

Выполнение измерений по настоящей методике обеспечивает получение результатов измерений содержания суммы афлатоксинов В1, В2, G1 и G2 в пробах в пищевой продукции и кормах в диапазоне измерений и с характеристиками относительной погрешности измерений при доверительной вероятности  $P = 0,95$ , приведенными в таблице 1.

Таблица 1 – Значения показателей точности, повторяемости, воспроизводимости и правильности (с пересчетом на афлатоксин В1)

Наименование (обозначение) микотоксина	Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_{r0}, \%$	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_{R0}, \%$	Показатель правильности (границы относительной неисключенной систематической погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$ ), $\pm \delta_c, \%$	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$ ), $\pm \delta, \%$
АВ <sub>1</sub>	9	10	8	25

## **4. Оборудование и материалы**

### **4.1 При работе с набором следует использовать следующие средства измерений, оборудование и материалы.**

Автоматический микропланшетный фотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, с пределом допускаемой погрешности измерения оптической плотности не более 5%.

Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 400 г и погрешностью взвешивания не более 0,1 г.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g.

Восьмиканальный дозатор переменного объема (50-300) мкл с погрешностью дозирования не более 5% со сменными одноразовыми наконечниками.

Одноканальные дозаторы переменного объема: (20-200) мкл с погрешностью дозирования не более 2%, (100-1000) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5% со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Водяная баня, обеспечивающая температуру нагрева (37–40) °С.

Лабораторный встряхиватель (вортекс), диапазон регулирования скорости (0-300) об/мин.

Лабораторный шейкер, обеспечивающий частоту вращения до 250 об/мин.

Мельница типа «Циклон» (Cyclotec Tecator, Швеция; ЛМТ-1, Россия и др.), снабженная металлическими ситами с отверстиями диаметром 1 мм, обеспечивающая 100%-ный проход частиц через указанные сита.

Мельница типа МЛЗ или других аналогичных марок по ТНПА, обеспечивающая требуемую крупность размола.

Сита лабораторные для мукомольной промышленности с номинальным размером круглого отверстия в свету или квадратного отверстия сетки 1 мм.

Гомогенизатор или бытовой блендер.

Секундомер или таймер.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры (20-25) °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру (2-8) °С с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше минус 18°С.

Воронки стеклянные.

Колбы конические стеклянные вместимостью 100 мл.

Стаканы стеклянные вместимостью 100 и 500 мл.

Цилиндры стеклянные вместимостью 25, 50, 100 и 500 мл

Пробирки центрифужные вместимостью 15 и 50 мл.

Флаконы из пластмассы вместимостью (20-40) мл с завинчивающейся крышкой.

Пробирки стеклянные или полипропиленовые вместимостью 5,0 мл.

Фильтры обеззоленные «белая лента».

Бумага индикаторная универсальная.

Стеклянные емкости с плотно закрывающимися крышками.

Пленка «парафильм», клейкая лента или крышка для микротитровально-го планшета.

Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметр 100 мм, высота 15 мм или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

Штатив для пробирок.

Перчатки резиновые или пластиковые.

Вода дистиллированная или деионизованная.

#### 4.2 Реактивы, используемые в работе

Кислота соляная х.ч. (плотность 1,19 г/мл, массовая доля HCl 38,3%).

Метанол, ч.д.а.

Натрия гидроокись, х.ч.

Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-СУММА АФЛАТОКСИНОВ для количественного определения суммы афлатоксинов В1, В2, G1 и G2, состав которой представлен в таблице 2.

*Примечание - Допускается применение другого оборудования и реактивов, не уступающих по своим свойствам и качеству приведенным выше.*

Таблица 2 – Состав тест-системы ПРОДОСКРИН® ИФА-СУММА АФЛАТОКСИНОВ

Компонент	Количество
Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
Планшет для смешивания	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
Градуировочные растворы С <sub>0</sub> , С <sub>1</sub> , С <sub>2</sub> , С <sub>3</sub> и С <sub>4</sub> с условными значениями концентрации афлатоксина В1 0; 2,0; 6,0; 20,0; 60,0 мкг/кг, готовы к использованию*	5 флаконов по 1,3 мл
Конъюгат, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
Промывочный раствор, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
Хромоген-субстратный раствор, готов к использованию**	1 флакон, 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон, 14 мл

*Примечание*

\*Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинных концентраций афлатоксина В1 в градуировочных растворах в массовые концентрации (мкг/кг) суммы афлатоксинов в образцах путем умножения на коэффициент 20, учитывающий фактор разведения при подготовке пробы из исследуемого сухого образца продукции. Это позволяет находить значение массовой доли суммы афлатоксинов в образце непосредственно по градуировочному графику.

\*\*В состав набора вместо хромоген-субстратного раствора могут быть включены раствор хромогена ТМБ (3,3',5,5'-тетрамтилбензидин), 1 флакон, 0,7 мл, и субстратный буферный раствор, 1 флакон, 14 мл.

## **5. Метод измерений**

В наборе ПРОДОСКРИН® ИФА-СУММА АФЛАТОКСИНОВ использован метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Афлатоксины экстрагируют из размолотого образца раствором метанол:вода = 70:30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносят конъюгат афлатоксина В1 с пероксидазой из корней хрена, добавляют градуировочные растворы с известной концентрацией афлатоксина В1 или подготовленные к анализу растворы проб и аликвоты полученной смеси переносят в лунки планшетного иммуносорбента. Во время последующей инкубации афлатоксин В1 в составе градуировочного раствора или афлатоксины анализируемой пробы конкурируют с конъюгатом за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок иммуносорбента. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами микотоксины, добавляют хромоген-субстратный раствор, который под действием фермента в составе, связанного с антителами конъюгата превращается в окрашенный продукт. Интенсивность окраски обратно пропорциональна содержанию афлатоксинов в анализируемом образце или градуировочном растворе, т.е. чем больше содержится афлатоксинов, тем меньше конъюгата связывается с антителами на твердой фазе. Затем добавляют стоп-реагент, останавливающий ферментативную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора с голубой на желтую. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на многоканальном планшетном фотометре как величину оптической плотности, выраженную в оптических единицах (о.е.), при длине волны 450 нм. На основании значений оптической плотности компьютерная программа строит градуировочный график и автоматически рассчитывает суммарную концентрацию афлатоксинов в исследуемых образцах.

Иммуноферментный метод измерений с использованием тест-системы ПРОДОСКРИН® ИФА-СУММА АФЛАТОКСИНОВ имеет специфичность, выраженную в значении нижнего предела чувствительности, который не превышает 2,0 мкг/кг.

## **6. Общие требования**

6.1 Реагенты набора, экстракты проб, градуировочные и другие растворы, применяемые в анализе, необходимо отбирать отдельными наконечниками к пипетке.

6.2 Не допускается использование набора после окончания срока годности.

6.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данного набора или отдельные компоненты из наборов других изготовителей.

6.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная стеклянная емкость. Вся используемая для приготовления реагентов стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта хромовой

смесью и многократно промыта водопроводной водой и сполоснута дистиллированной водой.

6.5 Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента, а также растворов в лунках планшета для смешивания. Во всех случаях следует избегать образования пены.

6.6 Если выполнение ИФА начато, то все последовательные стадии следует заканчивать, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени и выдерживая установленную продолжительность инкубации. Следует исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

6.7 Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности или держать компоненты на ярком свете во время инкубации или хранения.

6.8 Поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор перед использованием должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

6.9 Необходимо использовать микропланшетный фотометр и дозаторы пипеточные переменного объема, поверенные государственной метрологической службой.

## **7. Требования безопасности, охраны окружающей среды**

7.1 При работе с набором следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

7.2 Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе с анализируемыми образцами, экстрактами и стандартами для градуировки, так как они содержат афлатоксин В1, обладающий канцерогенным, мутагенным, тератогенным эффектами.

Метанол, входящий в состав экстрагирующего раствора, является сильным ядом. Не допускайте его контактов с кожей и глазами. В случае попадания на тело немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды.

Стоп-реагент содержит серную кислоту, которая обладает раздражающим действием. В случае попадания на кожу и слизистые оболочки пораженный участок следует немедленно промыть большим количеством проточной воды.

7.3 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

7.4 При работе следует надевать халат и одноразовые пластиковые или резиновые перчатки.

7.5 Химическая посуда и оборудование, которые используют при работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

7.6 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

## **8. Требования к квалификации операторов**

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц с высшим или средним специальным образованием, прошедших соответствующую подготовку и имеющих навыки работы в области иммуноферментного анализа. К проведению анализа допускается только персонал, ознакомленный с руководством по эксплуатации спектрофотометра и освоивший настоящую методику.

## **9. Требования к условиям измерений**

При выполнении измерений соблюдают следующие условия

- температура окружающего воздуха от +20 °С до +30 °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 %.

## **10. Подготовка к выполнению измерений**

### **10.1 Отбор и правила хранения проб**

Отбор образцов проводят по СТБ 1036, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 27668, ГОСТ ISO 6497, и другим ТНПА на конкретные виды продукции.

Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 25 °С в течение 30 суток без доступа влаги. Допускается хранение при температуре минус 18 °С в течение 6 месяцев в условиях, исключающих изменение их влажности. Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С.

### **10.2 Подготовка средств измерений**

Средства измерений, испытательное оборудование и вспомогательные устройства подготавливают к проведению измерений в соответствии с Руководством по эксплуатации.

### **10.3 Подготовка тест-набора, растворов и реагентов**

10.3.1 Перед проведением ИФА компоненты набора, подготовленные реагенты и исследуемые пробы выдерживают при температуре (20-25) °С в течение 60 мин без доступа света. Перед использованием жидкие реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием, избегая образования пены.

10.3.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб в микропланшетах согласно таблице 3, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и растворов двух параллельных проб каждого образца требуется две лунки (при исследовании проб в дубликатах).



Таблица 3 – Схема расположения лунок (при исследовании проб в дубликатах)

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C <sub>0</sub>	C <sub>0</sub>	П <sub>4</sub>	П <sub>4</sub>								
B	C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	П <sub>5</sub>	П <sub>5</sub>								
C	C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	П <sub>6</sub>	П <sub>6</sub>								
D	C <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	П <sub>7</sub>	П <sub>7</sub>								
E	C <sub>4</sub>	C <sub>4</sub>	П <sub>8</sub>	П <sub>8</sub>								
F	П <sub>1</sub>	П <sub>1</sub>	П <sub>9</sub>	П <sub>9</sub>								
G	П <sub>2</sub>	П <sub>2</sub>	П <sub>10</sub>	П <sub>10</sub>								
H	П <sub>3</sub>	П <sub>3</sub>	П <sub>11</sub>	П <sub>11</sub>								

*Примечания*

*C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> – градуировочные растворы в лунках А-Е стрипов №1 и №2, П<sub>1</sub>-П<sub>11</sub> – растворы проб в лунках F-H стрипов №1 и №2 и в лунках А-Н стрипов №3 и №4.*

*Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более 4 стрипов в одной группе исследований.*

**10.3.4 Подготовка иммуносорбента и планшета для смешивания.**

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно помещают в фольгированный пакет, заклеивают его клейкой лентой и хранят в холодильнике при температуре (2-8) °С в течение 6 месяцев, но не дольше срока годности набора.

Планшет для смешивания конъюгата и проб освобождают от упаковочного пакета. Необходимое количество стрипов, равное количеству стрипов иммуносорбента, устанавливают в рамку. Схема маркировки этих стрипов аналогична схеме маркировки иммуносорбента. Неиспользованные стрипы помещают в пакет и хранят при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

**10.3.5 Приготовление 20%-го раствора натрия гидроокиси.**

Взвешивают (10,0±0,1) г натрия гидроокиси в стакане вместимостью 100 мл и растворяют в 40 мл дистиллированной воды. После охлаждения до температуры (20-25) °С раствор переносят в полиэтиленовую емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения при температуре (20±5) °С – 1 мес.

**10.3.6 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=70:30 (70 %).**

В стакан вместимостью 500 мл цилиндром приливают 350 мл метанола и 150 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (20±5) °С – 3 мес.

10.3.7 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=35:65 (35%).

В стакан вместимостью 100 мл цилиндром приливают 35 мл метанола и 65 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре  $(20\pm 5)$  °С – 3 мес.

10.3.8 Приготовление рабочего промывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора интенсивно встряхивают в течение 10-20 с, в случае образования кристаллов помещают флакон на водяную баню при температуре 37 °С и выдерживают до полного растворения кристаллов.

Рабочий промывочный раствор готовят в стакане вместимостью 500 мл, разбавляя концентрат промывочного раствора дистиллированной водой в соотношении 1+9.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре  $(2-8)$  °С – 1 мес.

10.3.9 Приготовление хромоген-субстратного раствора (если потребуется).

Хромоген-субстратную смесь готовят в темных стеклянных или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор хромогена разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1+20) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 мл вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют в 20 раз меньшее количество раствора хромогена и интенсивно перемешивают в течение  $(30-40)$  с.

*Примечание – Субстратный буферный раствор и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.*

Приготовленный или поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

## **10.5 Подготовка проб**

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 7,1, до значений от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды.

Образцы зерна, зернобобовых и масличных культур, продуктов их переработки (отруби, жмыхи, шроты), макаронных и крупяных изделий, кормов размалывают на мельнице типа «Циклон». При отсутствии мельницы такого типа образец размалывают на лабораторной мельнице МЛЗ или

мельнице других аналогичных марок, не снабженных ситами. Затем просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1мм. Остаток на сите снова измельчают на мельнице марки МЛЗ так, чтобы он весь прошел через сито с отверстиями диаметром 1 мм, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Образцы хлебобулочных изделий и мучных кондитерских изделий измельчают с помощью гомогенизатора и перемешивают, образцы муки (мукомольных изделий) тщательно перемешивают.

Взвешивают две параллельные навески массой  $(5,0 \pm 0,1)$  г размолотого образца, приготовленного по п.7.2. Каждую навеску исследуемой пробы помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл или в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл. Далее цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода = 70:30. Важно соблюдать соотношение масса образца: объем экстрагирующей смеси = 1:5.

Коническую колбу или пробирку закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на встряхивателе при 150 об/мин в течение 5-7 мин.

Содержимое в пробирке центрифугируют в течение 10 мин при 4000 g и температуре (20-25) °С. При отсутствии центрифуги или при проведении экстракции в колбе раствор выдерживают в течение 5-10 мин для осаждения частиц и фильтруют аликвоту надосадочной жидкости в пробирку через бумажный фильтр («белая лента»).

Контроль рН фильтрата проводят с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения рН 6-8, с использованием концентрированной соляной кислоты или 20 %-ого раствора гидроксида натрия.

В чистую пробирку отбирают дозатором 0,5 мл фильтратов или супернатантов после центрифугирования (п.7.5), добавляют 0,5 мл воды и 1 мл 35 %-ного раствора метанола. Пробирки закрывают пробкой, растворы перемешивают на вортексе и используют для проведения ИФА в течение двух часов.

## **11. Порядок выполнения измерений**

11.1 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят конъюгат в объеме из расчета 0,8 мл на стрип.

Восьмиканальным дозатором отбирают по 75 мкл конъюгата и вносят в лунки планшета для смешивания (возможно использование одноканального дозатора). Затем в лунки планшета для смешивания в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 75 мкл градуировочных растворов в порядке возрастания их концентраций и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п.10.5.

При проведении одного единичного измерения для градуировочных растворов и растворов проб в лунки вносят по одной аликвоте этих растворов способом, описанным выше.

11.2 Используя восьмиканальную пипетку с новыми наконечниками, аккуратно перемешивают содержимое лунок стрипа путем пипетирования раствора вверх и вниз 3-4 раза, не допуская образования пены, и немедленно переносят по 100 мкл полученной смеси в соответствующие лунки иммуносорбента.

Примечание – Временной интервал от начала перемешивания до начала инкубирования – не более 3 мин с тем, чтобы минимизировать возможные артефакты, обусловленные разным временем протекания иммунохимической реакции в первых и последних стрипах.

11.3 Иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20-25)°С в течение 20 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшеты.

11.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканальной пипетки промывают лунки 4 раза по 200 мкл каждой рабочим промывочным раствором (п. 6.4), который предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 6,5 мл на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости, не допуская переполнения лунок и перетекания промывочного раствора между ними. Остатки жидкости удаляют, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

11.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят хромоген-субстратный раствор в объеме из расчета 1 мл на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 15 мин в термостате или на воздухе способом, исключая попадание света, при температуре (20-25)°С.

11.6 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента, предварительно внесенного в чашку Петри или пластмассовую кювету из расчета 1 мл на стрип. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

11.7 В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре ОП растворов в лунках при длине волны 450 нм.

## **12. Обработка результатов измерений**

Для построения градуировочного графика и расчета массовой доли суммы афлатоксинов в анализируемых образцах используют прилагаемый шаблон программы Microsoft Excel, поставляемый к набору на компакт-диске по запросу, или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра), после внесения необходимых параметров данного ИФА. В

расчетную программу введены условные значения концентраций афлатоксина В<sub>1</sub> в градуировочных растворах в терминах массовых концентраций (мкг/кг) с учетом установленного фактора разведения при пробоподготовке.

На основании внесенных оператором в таблицу раздела 1 прилагаемого шаблона измерений оптической плотности для каждого градуировочного раствора программным обеспечением строится градуировочный график зависимости  $\text{logit } B_i/B_0$  (ось ординат) от десятичного логарифма концентрации  $\text{log } C_i$  афлатоксина В<sub>1</sub> (ось абсцисс).

$$\text{logit } B_i/B_0 = \lg (B_i/B_0 / 1 - B_i/B_0), \quad (1)$$

где  $B_i$  – значение оптической плотности для  $i$ -го градуировочного раствора, о.е. (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

$B_0$  – значение оптической плотности для градуировочного раствора  $C_0$ , о.е. (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

$C_i$  – массовая доля афлатоксина В<sub>1</sub> в градуировочном растворе, выраженная в мкг/кг.

Программа автоматически рассчитывает на основании градуировочного графика массовую долю суммы афлатоксинов мкг/кг в лунках с анализируемой пробой после внесения оператором значений оптической плотности  $B_p$ , в о.е. в соответствующие графы таблицы раздела 2 прилагаемого шаблона.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение  $\bar{c}_p$  результатов измерений двух параллельных проб одного образца.

При проведении единичного измерения (одной пробы образца), за окончательный результат принимают полученное значение единичного измерения. Полученный результат округляют до первого десятичного знака.

ПО Microsoft Excel по специализированному шаблону таблиц, на основании градуировочной зависимости, автоматически рассчитывает массовую долю афлатоксина В<sub>1</sub> ( $W$ , мкг/кг) в исследуемых пробах с учетом фактора разведения при подготовке экстрактов проб к анализу по 10.5.

$$\lg W_i = \frac{a - \text{logit} \left( \frac{B_c}{B_0} \right)}{b} \quad (2)$$

$$W_i = 10^{\lg W_i} \cdot F \quad (3)$$

где  $W_i$  – массовая доля афлатоксина В<sub>1</sub> в исследуемой пробе, мкг/кг;

$B_c$  – оптическая плотность исследуемой пробы, мкг/кг;

$B_0$  – оптическая плотность пробы  $W_0$ , где массовая доля афлатоксина В<sub>1</sub> 0,00 мкг/кг;

$F$  – фактор разведения при приготовлении экстрактов проб по п. 10.5.

За результат измерений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> в исследуемой пробе ( $\bar{W}$ , мкг/кг) принимают среднее арифметическое значение двух результатов параллельных определений по (4)

$$\bar{W} = \frac{W_1 + W_2}{2} \quad (4)$$

при выполнении условия (5)

$$\frac{2 \cdot |W_1 - W_2| \cdot 100}{W_1 + W_2} \leq r_0 \quad (5)$$

где  $W_1, W_2$  – результаты двух параллельных определений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> в исследуемой пробе, мкг/кг;

$r_0$  – значение предела повторяемости в зависимости афлатоксина В<sub>1</sub> по таблице 8, %.

Если относительное расхождение превышает предел повторяемости  $r_0$ , необходимо получить еще два результата.

Если относительный размах (6) результатов четырех параллельных определений меньше или равен по значению критическому диапазону  $CR_{0,95}(4)$  для уровня вероятности 95 % и числа определений  $n = 4$

$$\frac{4 \cdot |W_{max} - W_{min}|}{W_1 + W_2 + W_3 + W_4} \leq C R_{0,95}(4), \quad (6)$$

где  $W_{max}, W_{min}$  – максимальный и минимальный результат из четырех параллельных определений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> в исследуемой пробе, мкг/кг, то в качестве окончательного результата измерений ( $\bar{W}$ , мкг/кг) указывают среднее арифметическое значение результатов четырех параллельных определений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> в исследуемой пробе по (7)

$$\bar{W} = \frac{W_1 + W_2 + W_3 + W_4}{4} \quad (7)$$

Значения критического диапазона представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Пределы повторяемости, воспроизводимости, критический диапазон в относительной форме при доверительной вероятности  $P = 0,95$

Наименование (обозначение) микотоксина	Предел повторяемости, $r_0$ , %	Предел воспроизводимости, $R_0$ , %	Критический диапазон, $CR_{0,95}(4)$ , %
АВ <sub>1</sub>	25	28	33

Если относительный размах результатов четырех параллельных определений больше критического диапазона по (6), результат измерений рассчитывают как медиана по (8)

$$\bar{W} = \frac{W_{(2)} + W_{(3)}}{2} \quad (8)$$

где  $W_{(2)}$  – второй наименьший результат из четырех параллельных определений массовой доли афлатоксина  $B_1$  в исследуемой пробе, мкг/кг;

$W_{(3)}$  – третий наименьший результат из четырех параллельных определений массовой доли афлатоксина  $B_1$  в исследуемой пробе, мкг/кг;

При этом выясняют и устраняют причины появления неприемлемых результатов параллельных определений.

### 13. Оформление результатов

Результат измерений массовой доли афлатоксина  $B_1$  ( $\bar{W}$ , мкг/кг) в исследуемых пробах, мкг/кг представляют в виде (9)

$$\bar{W} \pm \Delta \text{ (при } k = 2), \text{ мкг/кг,} \quad (9)$$

где  $\bar{W}$  – результат измерений массовой доли афлатоксина  $B_1$  в исследуемой пробе, мкг/кг;

$\Delta$  – значение абсолютной погрешности результата измерений массовой доли афлатоксина  $B_1$  при  $P = 0,95$ , мкг/кг, рассчитываемое по формуле (10)

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \bar{W}}{100} \quad (10)$$

где  $\bar{W}$  – результат измерений массовой доли афлатоксина  $B_1$  в исследуемой пробе, мкг/кг;

$\delta$  – значение показателя точности (относительной погрешности) по таблице 1, %.

Значение абсолютной погрешности измерений округляют до двух значащих цифр. Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение погрешности.

В случае, если окончательный результат измерений находится выше или ниже границ диапазона измерений, то расчет массовой доли афлатоксина  $B_1$  не проводят, результат оформляют в виде  $\bar{W} \leq W_{LOQ}$ , где  $W_{LOQ}$  – нижняя граница диапазона измерений, мкг/кг, либо  $\bar{W} \geq W_{HOQ}$ , где  $W_{HOQ}$  – верхняя граница диапазона измерений, мкг/кг.

### 14. Контроль качества результатов

14.1. Контроль прецизионности результатов измерений массовой доли афлатоксина  $B_1$  осуществляют в условиях внутрилабораторной прецизионности на основании результатов измерений массовой доли афлатоксина  $B_1$  при реализации методики измерений в лаборатории путём оценки показателя внутрилабораторной прецизионности. Показатель

внутрилабораторной прецизионности может быть оценен с применением стандартных образцов состава афлатоксина В<sub>1</sub> или реактива афлатоксина В<sub>1</sub> с массовой долей основного вещества не менее 95,00 %, рабочих проб с оформлением протокола установления показателей прецизионности результатов измерений с учетом положений, установленных в Приложении А РМГ 76 и не должен превышать значений показателя прецизионности в условиях воспроизводимости согласно таблице 1 настоящей методики измерений.

Оперативный контроль показателя прецизионности осуществляется внутри лаборатории путем оценивания показателей приемлемости, повторяемости и смещения (при контроле правильности с применением стандартных образцов афлатоксина В<sub>1</sub> или реактива афлатоксина В<sub>1</sub> с массовой долей основного вещества не менее 95,00 %) с периодичностью, установленной в конкретной лаборатории.

14.2 Контроль погрешности результатов измерений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> с применением образцов для контроля

Контроль погрешности результатов измерений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> проводят в соответствии с 5.5 РМГ 76 с применением образцов для контроля (далее – ОК) по Приложению Б настоящей методики измерений.

При реализации контрольной процедуры получают результат контрольного измерения массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> в ОК  $\bar{W}$  и сравнивают его с аттестованным значением  $A$ .

Результат контрольной процедуры ( $K_k$ , мг/см<sup>3</sup>) рассчитывают по формуле (11)

$$K_k = \bar{X} - A \quad (11)$$

Норматив контроля ( $K$ , мг/см<sup>3</sup>) рассчитывают по формуле (12)

$$K = \Delta \quad (12)$$

где  $\Delta$  – значение абсолютной погрешности результата измерений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub> при  $P = 0,95$ , рассчитываемое по формуле (10), мкг/кг.

Сопоставляют результат контрольной процедуры с нормативом контроля. Если результат контрольной процедуры удовлетворяет требованиям (13)

$$|K_k| \leq K \quad (13)$$

то процедуру анализа признают удовлетворительной.

В случае невыполнения условия (13) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

14.3 Результаты измерений, полученные при контроле погрешности результатов измерений, могут быть использованы при реализации контроля стабильности результатов измерений массовой доли афлатоксина В<sub>1</sub>. Процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.