

15106
23.04.2024

УТВЕРЖДАЮ
Директор
Института биоорганической химии
НАН Беларуси


А.В. Янцевич
«16» 04 2024 г.



УТВЕРЖДАЮ
Директор
ОДО «КомПродСервис»


Д.Ч. Кучинский
«16» 04 2024 г.



Извещение об изменении № 1 МВИ.МН 2786-2013

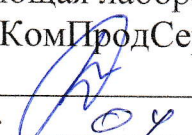
Методика выполнения измерения содержания афлатоксина М₁ в молоке,
масле, сыре и детском питании на основе сухого молока
с использованием тест-систем Ридаскрин® производства R-Biopharm AG
(Германия)

Разработчик:

Заведующий лабораторией
Института биоорганической химии
НАН Беларуси


О.В. Свиридов
«15» 04 2024 г.

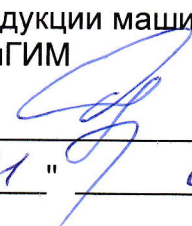
Заведующая лабораторией
ОДО «КомПродСервис»


Ю.А. Драгун
«16» 04 2024 г.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси ОДО «КомПродСервис»		Извещение №		Обозначение документа МВИ.МН 2786 -2013			
ИБОХ НАН Беларуси ОДО «КомПродСервис»							
Дата выпуска		Срок изменения			Лист 2	Листов 2	
ПРИЧИНА		Изменение эксплуатационных документов на тест-систему Ридаскрин® производства R-Biopharm AG (Германия) и применение методики измерений при использовании тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1»				КОД	
УКАЗАНИЕ О ЗАДЕЛЕ							
УКАЗАНИЕ О ВНЕДРЕНИИ		Входит в перечень стандартов к ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 033/2013					
ПРИМЕНЯЕМОСТЬ		При измерениях в сфере законодательной метрологии, а также вне ее					
РАЗОСЛАТЬ		Всем абонентам					
ПРИЛОЖЕНИЕ		На листах					
ИЗМ.		СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ					
1	Наименование методики измерений изложить в новой редакции: Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь МАССОВАЯ ДОЛЯ АФЛАТОКСИНА М₁ В МОЛОКЕ, МАСЛЕ, СЫРЕ И ДЕТСКОМ ПИТАНИИ НА ОСНОВЕ СУХОГО МОЛОКА Методика измерений методом ИФА с использованием тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1» Листы 2-20 заменить. Листы 21-28 ввести						
Составил				Согласовал			
Проверил				Н. контр.			
Изменение внес							

УТВЕРЖДАЮ

Начальник отдела по сертификации
продукции машиностроения и услуг
БелГИМ



" 31 " 05 2024 г. Т.Э.Якусевич

ЭКСПЕРТНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам метрологической экспертизы
извещения об изменении методики (метода) измерений

Обозначение и наименование:

МВИ.МН 2786-2013 «Методика выполнения измерения содержания афлатоксина М1 в молоке, масле, сыре и детском питании на основе сухого молока с использованием тест-систем Ридаскрин производства R-Biopharm AG (Германия)»

Разработчик: Институт биоорганической химии НАН Беларуси

На метрологическую экспертизу представлены следующие документы:

- 1 Извещение об изменении № 1 МВИ.МН 2786-2013.
- 2 Отчеты об экспериментальных исследованиях метрологических характеристик.
- 3 Протоколы проведения измерений в ходе выполнения эксперимента по оценке показателей точности.

По результатам метрологической экспертизы установлено:

1 Представленное извещение об изменении № 1 МВИ.МН 2786-2013 соответствует требованиям Правилам разработки и применения методик (методов) измерений, утвержденным постановлением Госстандарта от 23 апреля 2021 г. № 44, Методическим рекомендациям по оформлению методик (методов) измерений, утвержденным постановлением Госстандарта от 01.06.2021 № 61.

2 Замечания и предложения в части метрологических норм и требований отсутствуют.

Начальник отдела
испытаний пищевой
и сельскохозяйственной продукции



Н.В.Вощула

Содержание

Вводная часть.....	3
1 Нормативные ссылки	3
2 Показатели точности измерений	4
3 Средства измерений, программное обеспечение, вспомогательные устройства, материалы, реактивы.....	5
3.1 Средства измерений	5
3.2 Программное обеспечение, вспомогательные устройства	7
3.3 Материалы, реактивы.....	7
4 Метод измерений.....	8
5 Требования безопасности, охраны окружающей среды	9
6 Требования к квалификации персонала	9
7 Условия выполнения измерений.....	9
8 Условия применения и хранения реагентов и материалов.....	9
8.1 Инкубация планшетов в помещении	9
8.2 Условия хранения тест-систем.....	9
9 Подготовка к выполнению измерений	10
9.1 Отбор и хранение образцов	10
9.2 Подготовка лабораторной посуды	10
9.3 Приготовление растворов	10
9.4 Подготовка проб	11
9.5 Разбавление проб.....	15
9.6 Подготовка к проведению измерений	15
9.7 Подготовка оборудования	16
10 Выполнение измерений	16
10.1 Общие требования.....	16
10.2 Последовательность операций при выполнении измерений.....	16
11 Обработка результатов измерений	18
12 Оформление результатов измерений.....	19
12.1 Форма представления результата измерения с использованием погрешности.....	19
12.2 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием пределов измерения	19
13 Контроль погрешности результатов измерений	
13.1 Периодичность проведения контроля погрешности измерений.....	19
13.2 Проведение оперативного контроля процедуры анализа.....	20
13.2.1 Контроль повторяемости при реализации оперативного контроля процедуры анализа	20
13.2.2 Проведение оперативного контроля процедуры анализа с использованием контрольной процедуры для контроля погрешности с использованием образцов для контроля	20
13.2.3 Проведение оперативного контроля процедуры анализа с использованием контрольной процедуры для контроля погрешности с применением контрольной методики анализа.....	21
13.3 Контроль стабильности результатов анализа в форме периодической проверки подконтрольности процедуры выполнения анализа с применением образцов для контроля.....	22
Приложение А (справочное) Метрологические характеристики средств измерений	24
Приложение Б (справочное) Составы тест-систем	25
Приложение В (справочное) Специфичность тест-систем	26
Библиография.....	27
Лист регистрации изменений	28

Вводная часть

Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее – методика) массовой доли афлатоксина М₁ в молоке, масле, сыре и детском питании на основе сухого молока методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1».

Настоящая методика предназначена для применения при измерении массовой доли афлатоксина М₁ в сыром, пастеризованном, стерилизованном, восстановленном сухом молоке, восстановленном детском питании на основе сухого молока, масле сливочном, сухом молоке и сыре.

Диапазоны измерений массовой доли афлатоксина М₁ по настоящей методике составляют:

- для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, восстановленного сухого молока, восстановленного детского питания на основе сухого молока – от 5,0 нг/кг до 80,0 нг/кг;
- для масла сливочного – от 25,0 нг/кг до 400,0 нг/кг;
- для сухого молока и сыра – от 50,0 нг/кг до 800,0 нг/кг;
- Пределы измерений по данной методике составляют:
 - для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, восстановленного сухого молока, восстановленного детского питания на основе сухого молока – 5,0 нг/кг;
 - для масла сливочного – 25,0 нг/кг;
 - для сухого молока, сыра – 50,0 нг/кг;

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010, [1, 2] и может применяться при измерениях в сфере законодательной метрологии, а также вне её, в том числе в следующих областях:

- обеспечение защиты жизни и охрана здоровья человека;
- проведение испытаний и осуществление контроля за соответствием продукции и сырья требованиям законодательства;
- проведение лабораторно-диагностических исследований.

Методика может применяться в испытательных лабораториях любой принадлежности при испытаниях согласно указанной выше области применения с целью измерения в молоке и молочной продукции массовой доли афлатоксина М₁ при оценке соответствия требованиям технических нормативных правовых актов в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА) и для иных целей.

1 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие ТНПА:

СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности;
СТБ ISO 5725-2-2022	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений;
ГОСТ 8.010-2013	Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения;
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования;
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности;
ГОСТ OIML R 76-1-2011	Весы лабораторные. Общие технические требования;
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;

ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия;
ГОСТ 6995-77	Реактивы. Метанол-яд. Технические условия;
ГОСТ 9293-74	Азот газообразный и жидкий. Технические условия;
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия;
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
ГОСТ 28498-90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний;
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой;
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

Примечание – При пользовании настоящей методикой измерений целесообразно проверить действие ссылочных ТНПА на официальном сайте Национального фонда ТНПА в глобальной компьютерной сети Интернет.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящей методикой измерений следует руководствоваться действующими взамен ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

2 Показатели точности измерений

Настоящая методика обеспечивает измерения массовой доли афлатоксина M_1 в диапазонах и с показателями точности, указанными в таблице 1.

Оценка показателей повторяемости, внутрилабораторной воспроизводимости, правильности и точности измерений выполнялась согласно требованиям [2], СТБ ISO 5725-2.

Для проведения экспериментальных исследований по оцениванию показателей точности измерений использовались образцы с добавками афлатоксина M_1 . Выбросы в полученных данных эксперимента отсутствовали.

Таблица 1 – Диапазон измерений, относительные значения показателей повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости, правильности и точности

Виды продукции	Диапазон измерений, нг/кг	Показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторяемости) σ_r , %	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости (среднее квадратическое отклонение) σ_R , %	Показатель правильности (границы, в которых при $P=0,95$ находится неисключенная систематическая погрешность методики) $\pm \delta_c$, %	Показатель точности (границы, в которых при $P=0,95$ находится погрешность методики) $\pm \delta$, %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, восстановленное детское питание на основе сухого молока	от 5,0 до 80,0 включ.	7	6	8	13
Масло сливочное	от 25,0 до 400,0 включ.	7	6	7	13
Сухое молоко, сыр	от 50,0 до 800,0 включ.	7	6	8	13

При необходимости можно определять массовую долю афлатоксина М₁, превышающую верхний предел измерения настоящей методики. Для этого на этапе подготовки пробы п.9.4 проводится дополнительная процедура разбавления пробы испытываемого образца в необходимое количество раз, представленная в п. 9.5 методики.

Вышеперечисленные показатели точности относятся к результатам измерений, полученным согласно данной методике для неразбавленных проб.

Значения пределов повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости для двух результатов измерений массовой доли афлатоксина М₁ представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Относительные значения пределов повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р = 0,95

Виды продукции	Диапазон измерений, массовая доля нг/кг	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) <i>r</i> , %	Предел (внутрилабораторной) воспроизводимости (для двух результатов измерений) <i>R</i> , %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, восстановленное сухое молоко, восстановленное детское питание на основе сухого молока	от 5,0 до 80,0 включ.	18	15
Масло сливочное	от 25,0 до 400,0 включ.	19	15
Молоко сухое, сыр	от 50,0 до 800,0 включ.	19	15

3 Средства измерений, программное обеспечение, вспомогательные устройства и материалы, реактивы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, программное обеспечение, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.

3.1 Средства измерений

При выполнении измерений применяют средства измерений, сведения о которых указаны в таблице 3.

Таблица 3 –Средства измерений

Тип средства измерений; модификация средства измерений	Метрологические и технические характеристики
1	2
Фотометры универсальные Ф300; Фотометр универсальный Ф300ТП	– диапазон измерения оптической плотности: от 0,0 до 1,5 Б на длинах волн от 340 до 400 нм; от 0 до 2,5 Б на длинах волн от 401 до 700 нм; – пределы допускаемой абсолютной погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0 до 0,400 Б: ±0,020 Б; – пределы допускаемой относительной погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0,401 до 2,500 Б: ±5,0 %; – пределы допускаемого среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0 до 0,400 Б: ±0,006 Б;

Продолжение таблицы 3

1	2
	– пределы допускаемого среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0,401 до 2,500 Б: $\pm 1,5\%$; – номинальная цена единицы младшего разряда результата измерений – 0,001 Б.
Весы лабораторные электронные PS; Весы лабораторные электронные PS 360/C/2/N	– класс точности весов по ГОСТ OIML R 76-1: высокий; – максимальная нагрузка: 360 г; – минимальная нагрузка: 0,02 г; – действительная цена деления: 1 мг; – пределы допускаемой погрешности весов, в интервалах взвешивания от 0,02 г до 50 г включ., св. 50 г до 200 г включ., св. 200 г до 360 г включ.: $\pm 5,0$ мг; $\pm 10,0$ мг; $\pm 15,0$ мг.
Термометры стеклянные лабораторные ТЛ-2; Термометр стеклянный лабораторный ТЛ-2 №1	– диапазон измеряемых температур: от минус 30 °С до 70 °С; – цена деления: 1,0 °С; – пределы допускаемой абсолютной погрешности: $\pm 1,0$ °С.
Приборы измерительные ПИ-002; Прибор измерительный ПИ-002/1	– диапазон измерений температуры: от 5 °С до 40 °С; – диапазон измерений относительной влажности: от 5 % до 98 %; – пределы допускаемой абсолютной погрешности измерения температуры: $\pm 0,5$ °С; – пределы допускаемой абсолютной погрешности измерения относительной влажности: $\pm 3\%$.
Секундомер электронный «Интеграл С-01»; Секундомер электронный «Интеграл С-01»;	см. приложение А
Дозаторы механические Acura manual; Дозаторы механические Acura manual 825, Acura manual 835.	см. приложение А

Допускается применение других средств измерений с метрологическими и техническими характеристиками, не хуже указанных ниже:

а) фотометр для микропланшетов, обеспечивающий измерение на длине волны 450 нм с пределами погрешности измерения оптической плотности $\pm 0,02$ Б в диапазоне измерений от 0 до 0,4 Б и пределами относительной погрешности измерения оптической плотности $\pm 5\%$ в диапазоне измерений свыше 0,4 Б;

б) весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания не менее 200 г, пределами допускаемой погрешности $\pm 0,01$ г;

в) средство измерений для измерения температуры и влажности воздуха:

- с диапазоном измерений температуры, включающим диапазон от 15 °С до 25 °С, и пределами относительной погрешности измерений температуры ± 1 °С;

- с диапазоном измерений относительной влажности, включающим диапазон от 15 % до 80 %, и пределами относительной погрешности измерений относительной влажности $\pm 3\%$;

г) термометр лабораторный частичного погружения с ценой деления 1 °С с диапазоном измерений, включающим в себя диапазон значений от минус 18 °С до 25 °С.

д) дозаторы пипеточные:

- с диапазоном объемов дозирования от 20 мм³ до 200 мм³ и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0\%$;

- с диапазоном объемов дозирования от 100 мм³ до 1000 мм³ и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5\%$;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 см³ до 10 см³ и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0\%$;

Для проведения работ, согласно настоящей методике, используют средства измерений, допущенные к применению в Республике Беларусь и прошедшие метрологическую оценку в установленном порядке.

3.2 Программное обеспечение, вспомогательные устройства

Программное обеспечение (далее ПО) «RIDA®Soft», версии 7.01 и выше, разработанное R-Biopharm AG (Германия).

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (при использовании ротора для пробирок вместимостью 15 см³), а также охлаждение до 10 °С.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры 40 °С, 55 °С с точностью ± 5 °С.

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от 2 °С до 8 °С в холодильной камере и не более минус 18 °С в морозильной камере.

Лабораторный вортекс, обеспечивающий частоту вращения не менее 1800 об/мин.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий скорость вращения до 60 об/мин.

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

Дозатор пипеточный многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 50 мм³ до 250 мм³ и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального $\pm 4,6\%$ (при отсутствии автоматического устройства для отмывки иммунологических планшетов).

Использование следующего оборудования не является обязательным, но рекомендуется для увеличения производительности и повышения точности измерений:

– система для выпаривания в токе азота или воздуха, обеспечивающая поддержание температуры (55 ± 5) °С или роторный испаритель в комплекте с водяной баней, обеспечивающей поддержание температуры (55 ± 5) °С;

– инкубатор (термостат) для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температур от 20 °С до 25 °С с точностью ± 1 °С;

– устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету, от 100 мм³ до 250 мм³.

Допускается применение других вспомогательных устройств с техническими характеристиками не хуже указанных.

3.3 Материалы, реактивы

Пленка «парафильм» или скотч.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Штатив для пробирок.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 см³.

Пробирки стеклянные вместимостью 5 см³ или 10 см³ по ГОСТ 1770.

Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 1,5 см³.

Пипетки Пастера стеклянные или пластмассовые.

Колбы мерные вместимостью 100 см³ типа 2-100-2 и 1000 см³ типа 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Колбы конические вместимостью 100 см³; 500 см³ по ГОСТ 25336.

Стаканы Н-1-100 или Н-1-150, Н-1-1000 по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные вместимостью 2; 5; 10 см³ 2-ого класса точности по ГОСТ 29227.

Палочки стеклянные оплавленные.
Шпатель пластмассовый или металлический.
Цилиндры мерные вместимостью 100 см³, 500 см³ типа 3-100-2, 3-500-2 по ГОСТ 1770.

Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметром 100 мм³, высотой 15 мм³ или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

Емкости из полимерных материалов или стекла для хранения химических веществ с плотно закрывающимися крышками вместимостью 50 – 100 см³.

Одноразовые полипропиленовые наконечники для дозаторов пипеточных.

Метилен хлористый х.ч. (дихлорметан) по [3].

н-Гексан х.ч. по [4].

Метанол по ГОСТ 6995.

Моющее средство (детергент), не содержащее ферментных или ингибирующих добавок. Рекомендуются использовать лабораторный детергент, например, Triton X-100.

Азот газообразный повышенной чистоты по ГОСТ 9293 (необходим, если выпаривание производится в токе азота).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизованная.

Тест-система «Ridascreen® Aflatoxin M1» производства R-Biopharm AG (Германия), каталожный номер R1121 или тест-система «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН M1» по [5] в составах, указанных в приложении Б, и специфичностью – в приложении В.

Допускается использовать другие материалы и реактивы по качеству не хуже вышеуказанных, а также тест-системы, имеющие комплектацию и характеристики, аналогичные указанным. Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-систем других партий не допускается.

4 Метод измерений

Измерения массовой доли афлатоксина M₁ выполняют методом конкурентного колориметрического иммуноферментного анализа (ИФА). Принцип метода основан на измерении оптической плотности градуировочных растворов и растворов проб в ходе проведения ИФА.

В ходе ИФА на первой стадии анализа в лунки микротитровального планшета или иммуносорбента (далее – планшет), покрытого антителами захвата, добавляются специфические антитела к афлатоксину M₁, которые биоспецифически адсорбируются в лунках планшета. После стадий адсорбции антител и промывки добавляют градуировочные растворы и растворы проб анализируемых продуктов, подготовленные к анализу. В результате происходит связывание афлатоксина M₁, присутствующего в растворах, с адсорбированными антителами в лунках. После инкубации и последующей промывки добавляется конъюгат афлатоксина с пероксидазой хрена, который связывается со свободными центрами связывания антител, с образованием иммунного комплекса конъюгат-антитело, количество которого обратно пропорционально массовой доле афлатоксина M₁ в пробах. После инкубации не связавшиеся реагенты удаляются на стадии промывки. Затем добавляется раствор субстрата/хромогена (перекись водорода/тетраметилбензидин) или хромоген-субстратный раствор и связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт. Реакция окрашивания останавливается внесением стоп-реагента (серной кислоты). Интенсивность окрашивания измеряется с применением фотометра для микропланшетов при длине волны 450 нм.

Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации афлатоксина M₁ в градуировочном растворе или в растворе анализируемой пробы. Массовая доля афлатоксина M₁ в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием шести градуировочных растворов афлатоксина M₁.

5 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении измерений массовой доли афлатоксина М₁ соблюдают следующие требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности при работе в химической лаборатории в соответствии с инструкциями, утвержденными в установленном порядке;
- техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений;
- инструкции (или иного документа) по сбору и утилизации используемых веществ, действующей в организации, использующей методику.

Персонал, работающий с органическими растворителями, должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования инструкций по технике безопасности при работе с органическими растворителями, действующих в организации. Все работы должны проводиться строго в вытяжном шкафу с использованием средств индивидуальной защиты (фартуки, перчатки, очки) при включенной приточно-вытяжной вентиляции.

6 Требования к квалификации персонала

К выполнению измерений и (или) обработке их результатов по данной методике допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных настоящей методикой, владеющие техникой постановки ИФА.

7 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С;
- температура окружающего воздуха при приготовлении растворов (20±5) °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С.

8 Условия применения и хранения реагентов и материалов

8.1 Инкубация планшетов в помещении

При отсутствии инкубатора планшеты могут инкубироваться в помещении при выполнении следующих условий:

- температура окружающего воздуха должна быть от 20 °С до 25 °С;
- не допускается попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под планшет теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту методики, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например, в ящик стола;
- во время инкубации не допускается встряхивания или постукивания планшетом по столу.

8.2 Условия хранения тест-систем

Хранение тест-систем осуществляется в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке в течение всего срока годности тест-

систем. Замораживание тест-систем с целью увеличения их срока хранения не допускается.

Хранение неиспользованных стрипов (лунок) осуществляется в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в плотно закрытом оригинальном пакете. Срок хранения – в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Необходимо исключить прямое попадание света на раствор субстрата/хромогена и хромоген-субстратный раствор.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор и хранение образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036 или иным ТНПА по отбору проб конкретных видов продукции. При необходимости отобранные образцы хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 сут или в замороженном виде при температуре не выше минус 18 °С не более 14 сут. Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от 2 °С до 8 °С. Упаковка образцов должна исключить попадание влаги при хранении.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе специализированного моющего средства промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой два раза и высушивают.

Запрещается:

- многократное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование бытовых моющих средств для мойки лабораторной посуды.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление промывочного буфера при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1»

В зависимости от планируемого срока использования промывочный буфер, представляющий собой 10 мМ фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,05 % твин-20, готовят одним из приведенных ниже способами:

а) содержимое пакета для приготовления промывочного буфера количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³. Добавляют небольшое количество дистиллированной воды, содержимое колбы перемешивают до полного растворения осадка, после чего доводят до метки дистиллированной водой. Полученный раствор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 6 нед в стеклянной или полиэтиленовой посуде;

б) содержимое пакета для приготовления промывочного буфера количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³. Добавляют 50 – 60 см³ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения осадка и доводят до метки дистиллированной водой. Полученный концентрированный раствор (10-кратное концентрирование) хранят при температуре от 20 °С до 25 °С не более 12 нед. Для приготовления готового раствора промывочного буфера 10 см³ концентрата переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки дистиллированной водой.

9.3.2 Приготовление промывочного буфера при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1»

Содержимое флакона с концентратом промывочного буфера интенсивно встряхивают в течение 10-20 с, в случае образования кристаллов – подогревают на водяной бане при температуре 40 °С. Отмеренный мерным цилиндром необходимый

объем концентрата наливают в стакан вместимостью 1000 см³, после чего в стакан наливают в девять раз больший объем дистиллированной воды и перемешивают. Полученный раствор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 мес в стеклянной или полиэтиленовой посуде.

9.4 Подготовка проб

9.4.1 Подготовка проб сырого, пастеризованного и стерилизованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 9.1. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая молоко при температуре окружающей среды. Перед взятием аликвоты испытуемый образец перемешивают путем встряхивания и переворачивания представленной упаковки.

От образца сырого, стерилизованного, пастеризованного молока, подготовленного, как описано выше с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 10 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробы в следующем режиме: 10 °С, 4000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 – 15 мин, охлаждая их до температуры от 2 °С до 4 °С, контролируя температуру термометром. Не допускается замораживание пробы.

Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования.

Отбирают дозатором по 1 см³ обезжиренной пробы из каждой пробирки и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см³ (перед тем как вылить молоко в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления следов жира).

Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Полученные растворы проб обезжиренного молока используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С не более 2 ч.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

9.4.2 Подготовка проб сухого молока

9.4.2.1 Восстановление сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 9.1. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая молоко при температуре окружающей среды. Перед взятием пробы испытуемый образец тщательно перемешивают путем переворачивания представленной упаковки.

В стаканы вместимостью 100 см³ или 150 см³ помещают две параллельные навески образца сухого молока, массой 10,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5 – 10 см³ приливают дистиллированную воду, нагретую до температуры 40 °С, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения сухого молока растворы из стаканов охлаждают до температуры от 20 °С до 25 °С и количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

С помощью дозатора из каждой колбы с восстановленным сухим молоком отбирают аликвоту объемом 10 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробы в следующем режиме: 10 °С, 4000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 – 15 мин, охлаждая их до температуры от 2 °С до 4 °С, контролируя температуру термометром. Не допускается замораживание пробы.

Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования.

Отбирают по 1 см³ обезжиренной пробы из каждой пробирки и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см³ (перед тем как вылить молоко в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления следов жира).

Для обезжиренного сухого молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Полученные растворы проб молока используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С не более 2 ч.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают

9.4.3 Подготовка проб детского питания на основе сухого молока

9.4.3.1 Восстановление детского питания на основе сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 9.1. Доводят температуру образца от 20 °С до 25 °С, выдерживая при температуре окружающей среды. Перед взятием пробы испытуемый образец тщательно перемешивают путем переворачивания представленной упаковки.

Образец детского питания массой 100 г – 150 г гомогенизируют в блендере или гомогенизаторе в течение 3 – 5 мин.

Взвешивают две параллельные навески массой 10,0 г гомогенизированной смеси с точностью до 0,1 г и помещают в мерные колбы вместимостью 100 см³. Затем в колбы с навесками порциями по 5 – 10 см³ приливают дистиллированную воду, нагретую до температуры 40 °С, перемешивая содержимое на шейкере до полного растворения образца. После растворения смеси растворы охлаждают до температуры от 20 °С до 25 °С и доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Полученные растворы проб восстановленной смеси используются для подготовки проб для проведения ИФА. Допускается хранение восстановленной смеси при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С не более 2 ч.

9.4.3.2 Подготовка проб восстановленного детского питания на основе сухого молока

С помощью дозатора из каждой колбы с восстановленным детским питанием отбирают пробу объемом 2 см³ и помещают в полипропиленовые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Добавляют в пробирки 8 см³ дихлорметана, отмеренного дозатором или пипеткой, плотно закрывают пробирки завинчивающимися пробками и перемешивают при переворачивании на ротаторе при 30 об/мин в течение 15 мин при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С.

Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20 °С – 25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки полностью удаляют верхний слой и отбирают дозатором или пипеткой нижнюю фазу (дихлорметановый экстракт) объемом 4 см³, который переносят в стеклянные пробирки вместимостью 10 см³. Выпаривают досуха дихлорметан из пробирок в токе азота на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С. Допускается проводить выпаривание на роторном испарителе или выпаривать экстракт досуха в полипропиленовых пробирках для центрифугирования, вместимостью 15 см³, на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С в вытяжном шкафу.

Растворяют осадок в пробирках после внесения следующих растворов:

– 1 см³ буфера для образцов при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1»;

– 1 см³ буфера 2 для разбавления проб при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1».

Перемешивают содержимое на вортексе при 150 – 200 об/мин в течение 1 мин, после чего добавляют 1 см³ н-гексана. Полученную смесь снова перемешивают на вортексе в течение 1 – 2 мин до полного растворения осадка. В случае использования роторного испарителя или стеклянных пробирок для выпаривания, смесь переносят в центрифужные пробирки вместимостью 15 см³. Затем пробирки центрифугируют в режиме: 20 °С – 25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

Дозатором отбирают аликвоту буферного слоя объемом 0,5 см³ в чистые микроцентрифужные вместимостью 1,5 см³ и используют для проведения ИФА.

Допускается хранение подготовленных проб при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С не более 2 ч.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

9.4.4 Подготовка проб сыра

Для подготовки проб используют образцы, отобранные в соответствии с 9.1.

Доводят температуру образцов от 20 °С до 25 °С, выдерживая при температуре окружающей среды. Отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, срезают верхнюю поверхность с признаками плесени, после чего гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера или измельчают с использованием терки.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают в полипропиленовые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Добавляют в пробирки 8 см³ дихлорметана, отмеренного дозатором или пипеткой, плотно закрывают пробирки заворачивающими пробками и перемешивают при переворачивании на ротаторе при 30 об/мин в течение 15 мин при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С. После этого пробирки выдерживают на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С в течение 15 мин, пять или шесть раз интенсивно перемешивая содержимое на вортексе при 150 – 200 об/мин в течение 1 мин.

Затем суспензию центрифугируют в режиме: 20 °С – 25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки полностью удаляют верхний слой и отбирают дозатором или пипеткой нижнюю фазу (дихлорметановый экстракт) объемом 4 см³, который переносят в стеклянные пробирки вместимостью 10 см³. Выпаривают дихлорметан из пробирок в токе азота на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С до получения маслянистого осадка. Допускается проводить выпаривание на роторном испарителе или выпаривать экстракт в пробирках для центрифугирования, вместимостью 15 см³, на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С в вытяжном шкафу.

Растворяют маслянистый осадок в пробирках после внесения следующих растворов:

– 0,5 см³ метанола и 0,5 см³ буфера для образцов при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1»;

– 1 см³ буфера 1 для разбавления проб при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1».

Перемешивают содержимое на вортексе при 150 – 200 об/мин в течение 1 мин, после чего добавляют 1 см³ н-гексана. Полученную смесь снова перемешивают на вортексе в течение 1 – 2 мин до полного растворения осадка. В случае использования роторного испарителя или стеклянных пробирок для выпаривания смесь переносят в центрифужные пробирки вместимостью 15 см³. Затем пробирки центрифугируют в

режиме: 20 °С – 25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

С использованием дозаторов отбирают аликвоту буферного слоя объемом 0,05 см³ в чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см³, в которые предварительно вносят:

- 0,45 см³ буфера для образцов при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1»;

- 0,45 см³ буфера 1 для разбавления проб при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1».

Тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин и используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С не более 1 ч.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают.

9.3.5 Подготовка проб масла сливочного

Образцы масла сливочного, отобранные в соответствии с 9.1, охлажденные до температуры не более минус 10 °С, измельчают с помощью терки, перемешивают и доводят температуру от 20 °С до 25 °С, выдерживая при температуре окружающей среды.

От образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают в полипропиленовые пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 см³ хлористого метилена (дихлорметана), плотно закрывают пробирки завинчивающимися пробками и перемешивают при переворачивании на ротаторе при 30 об/мин в течение 15 мин при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С. После этого пробирки выдерживают на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С в течение 15 мин, пять или шесть раз интенсивно перемешивая содержимое на вортексе при 150 – 200 об/мин в течение 1 мин.

Затем суспензию центрифугируют в режиме: 20 °С – 25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования из каждой пробирки полностью удаляют верхний слой и отбирают дозатором или пипеткой нижнюю фазу (дихлорметановый экстракт) объемом 4 см³, который переносят в стеклянные пробирки вместимостью 10 см³. Выпаривают дихлорметан из пробирок в токе азота на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С до получения маслянистого осадка. Допускается проводить выпаривание на роторном испарителе или выпаривать экстракт в пробирках для центрифугирования, вместимостью 15 см³, на водяной бане при температуре (55 ± 5) °С в вытяжном шкафу.

Растворяют маслянистый осадок в пробирках после внесения следующих растворов:

- 0,5 см³ метанола и 0,5 см³ буфера для образцов при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1»;

- 1 см³ буфера 1 для разбавления проб при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1».

Перемешивают содержимое на вортексе при 150 – 200 об/мин в течение 1 мин, после чего добавляют 1 см³ н-гексана. Полученную смесь снова перемешивают на вортексе в течение 1 – 2 мин до полного растворения осадка. В случае использования роторного испарителя или стеклянных пробирок для выпаривания смесь переносят в центрифужные пробирки вместимостью 15 см³ и затем центрифугируют в режиме: 20 °С – 25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

Проводят процедуру обезжиривания проб еще раз, добавляя к раствору 1 см³ н-гексана. Полученную смесь снова перемешивают на вортексе в течение 1 – 2 мин и

затем центрифугируют в режиме: 20 °С – 25 °С, 4000 g, 10 мин. После центрифугирования полностью удаляют верхний слой гексана пипеткой Пастера или дозатором.

С использованием дозаторов отбирают аликвоту буферного слоя объемом 0,20 см³ в чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см³, в которые предварительно вносят:

- 0,30 см³ буфера для образцов при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1»;

- 0,30 см³ буфера 1 для разбавления проб при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1».

Тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин и используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С не более 1 ч.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают

9.5 Разбавление проб

В случае, когда массовая доля афлатоксина М₁ в пробе превышает верхний предел измерения настоящей методики, выполняется разбавление раствора пробы, подготовленной по 9.4, буфером для образцов при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1» и буфером 2 для разбавления проб при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1».

Для проведения разбавления аликвота раствора пробы доводится до требуемого объема соответствующим буфером. Степень разбавления характеризуется коэффициентом разбавления F , рассчитываемым по формуле

$$F = \frac{V_p}{V_a}, \quad (1)$$

где V_p – объем разбавленного раствора пробы, см³;

V_a – объем аликвоты исходного раствора пробы, см³.

Величина коэффициента разбавления F , и, следовательно, объема V_p , определяется ожидаемой величиной массовой доли афлатоксина М₁ в образце продукции, поступившей для анализа.

В случае, когда разбавления не проводится, принимается, что $F=1$.

Тщательно перемешивают содержимое пробирок после разбавления на вортексе в течение 1 мин и используют для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных разбавленных растворов проб при температуре от 20 °С до 25 °С не более 1 ч.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы проб перемешивают

9.6 Подготовка к проведению измерений

9.6.1 Предварительная подготовка и порядок применения тест-систем

Тест-систему извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета или иммуносорбента, и выдерживают при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С в течение 1 ч, доводят температуру остальных реагентов от 20 °С до 25 °С.

Перед использованием жидкие реагенты необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов.

Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-систем других партий не допускается.

Не допускается переливать обратно в оригинальные флаконы остатки реагентов, используемые при проведении измерений.

Не допускается использование реагентов, имеющих следующие признаки распада:

- голубая окраска раствора хромогена/субстрата или хромоген-субстратного раствора до внесения его в лунки;

– оптическая плотность первого градуировочного раствора (концентрация 0 нг/дм³) менее 0,8.

9.6.2 Подготовка планшета

Планшет со стрипами, предварительно подготовленными в соответствии с п 9.6.1, вынимают из упаковки. В рамку планшета помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок.

Количество лунок планшета, необходимых для проведения анализа N_W , рассчитывают по формуле

$$N_W = 12 + 2 \cdot N_{SMP}, \quad (2)$$

где 12 – количество лунок для градуировочных растворов;

N_{SMP} – количество образцов.

Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с 8.2.

Размечают положения лунок, предназначенных для градуировочных растворов и растворов проб, согласно рисунку 1, с учетом выполнения по два единичных измерения для градуировочных растворов и растворов двух параллельных проб каждого образца.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-1	C-1	П-3	П-3	П-11	П-11						
B	C-2	C-2	П-4	П-4	П-12	П-12						
C	C-3	C-3	П-5	П-5	П-13	П-13						
D	C-4	C-4	П-6	П-6	П-14	П-14						
E	C-5	C-5	П-7	П-7	П-15	П-15						
F	C-6	C-6	П-8	П-8	П-16	П-16						
G	П-1	П-1	П-9	П-9	П-17	П-17						
H	П-2	П-2	П-10	П-10	П-18	П-18						

C -1,... C-6 – градуировочные растворы № 1 – № 6. П-1, П-2,... П-18 – измеряемые пробы.

1,2,...12 – номера стрипов в планшете. A, B,... H – обозначения лунок в стрипах.

Рисунок 1 – Схема расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб

Не рекомендуется одновременно использовать более шести стрипов. При необходимости исследовать большее количество проб анализ выполняется в несколько этапов.

9.7 Подготовка оборудования

Подготовку оборудования к работе, включение и выведение на рабочий режим осуществляют согласно эксплуатационной документации.

10 Выполнение измерений

10.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.4 или п. 9.5. Компоненты тест-систем подготавливают в соответствии с п. 9.6 и п. 9.3.

10.2 Последовательность операций при выполнении измерений

10.2.1 В каждую лунку планшета вносят отобранные дозатором аликвоты раствора антител объемом 100 мм³. Не допускается встряхивания или постукивания планшетом по столу.

Заклеивают планшет пленкой или закрывают крышкой и инкубируют в течение 15 мин в инкубаторе (термостате) для микротитровальных планшетов или на воздухе

способом, исключающим попадание света, при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С.

10.2.2 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета и удаления жидкости путем энергичного трехкратного постукивания по поверхности стола, покрытой сухой фильтровальной бумагой. Затем с помощью многоканального дозатора проводят 3-кратное промывание планшета по 250 мм³ на одно промывание лунки промывочным буфером, приготовленным по п. 9.3.1 (при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1») или по п. 9.3.2 (при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН M1»). Промывочный буфер предварительно вносят в чашку Петри или кювету для дозирования жидких реагентов в объеме из расчета 6,5 – 7 см³ на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости; не допуская переполнения лунок и перетекания промывочного буфера между ними. При каждом промывании остатки промывочного буфера удаляют, постукивая перевернутым планшетом по ровной поверхности стола, покрытой фильтровальной бумагой.

Примечание – В процессе работы следует избегать высыхания лунок в перерывах между отдельными этапами работы и увеличения длительности перерывов. Точность результатов измерений зависит от равномерного промывания лунок, поэтому следует тщательно соблюдать процесс промывки. Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для промывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – 3, объем используемого промывочного раствора – 250 мм³.

10.2.3 В лунки промытого планшета в соответствии с их маркировкой (рисунок 1) одноканальным дозатором вносят две аликвоты по 100 мм³ каждого из градуировочных растворов в порядке возрастания их концентраций и подготовленные растворы двух параллельных проб каждого образца. Не допускается встряхивания или постукивания планшетом по столу после внесения растворов.

Заклеивают планшет пленкой или закрывают крышкой и инкубируют в течение 30 мин в инкубаторе (термостате) для микротитровальных планшетов или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от 20 °С до 25 °С. По окончании времени инкубации промывают планшет согласно п. 10.2.2.

10.2.4. В каждую лунку промытого планшета вносят отобранные дозатором аликвоты раствора конъюгата объемом 100 мм³. Не допускается встряхивания или постукивания планшетом по столу после внесения раствора конъюгата.

Заклеивают планшет пленкой или закрывают крышкой и инкубируют в течение 15 мин в инкубаторе (термостате) для микротитровальных планшетов или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре окружающей среды от 20 °С до 25 °С. По окончании времени инкубации промывают планшет согласно п. 10.2.2.

10.2.5 В каждую лунку промытого планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 100 мм³ раствора субстрата/хромогена (при использовании тест-систем «Ridascreen® Aflatoxin M1») или субстрат-хромогенного раствора (при использовании тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН M1»), предварительно нагретых до температуры от 20 °С до 25 °С.

Аккуратно круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают содержимое. Заклеивают планшет пленкой или закрывают крышкой и инкубируют в течение 15 мин в инкубаторе (термостате) для микротитровальных планшетов или на воздухе способом, исключающим попадание света, при температуре от 20 °С до 25 °С. Отсчет времени инкубации начинают немедленно после окончания внесения растворов субстрата/хромогена или субстрат-хромогенного раствора.

10.2.6 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мм³ стоп-реагента, предварительно внесенного в чашку Петри или кювету для дозирования жидких реагентов в объеме из расчета 0,9 см³ стрип. Растворы в

лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряют в фотометре для микропланшетов оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм.

10.2.7 Регистрацию промежуточных измерений проводят в журнале по форме, предусмотренной системой менеджмента лаборатории.

11 Обработка результатов измерений

11.1 Обработка результатов измерений оптической плотности производится с помощью ПО следующим образом.

11.2 Определяется процент связывания для каждого градуировочного раствора относительно градуировочного раствора 1, как $\frac{B_i}{B_0} \cdot 100 \%$, где B_i – оптическая плотность i -го градуировочного раствора ($i=1\dots6$); B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора, содержащего 0 нг/дм³ афлатоксина М₁.

11.3 По рассчитанным значениям процента связывания и значениям массовой концентрации афлатоксина М₁ в градуировочных растворах устанавливают градуировочную зависимость, используемую для расчета массовой доли афлатоксина М₁ в растворах проб.

11.4 Определяют процент связывания для раствора пробы относительно градуировочного раствора 1, как $\frac{B_{sam}}{B_0} \cdot 100 \%$, где B_{sam} – оптическая плотность раствора исследуемой пробы.

11.5 По рассчитанным значениям процента связывания для раствора пробы определяют по градуировочной зависимости значение массовой концентрации афлатоксина М₁ в исследуемом растворе пробы.

11.6 Фактическое значение массовой доли афлатоксина М₁ в пробе X , нг/кг, получают путем умножения полученного с помощью ПО значения массовой концентрации афлатоксина в растворе пробы, на соответствующий фактор разбавления, приведенный в таблице 3.

11.7 В случае дополнительного разбавления пробы по 9.5 окончательный результат измерения рассчитывают по формуле

$$X = k \cdot X' \cdot F, \quad (3)$$

где X – массовая доля афлатоксина М₁ в исследуемой пробе, нг/кг;

k – фактор разбавления, учитывающий разбавление на всех стадиях подготовки пробы;

X' – результат измерений афлатоксина М₁ в исследуемом растворе пробы, нг/дм³;

F – коэффициент разбавления пробы, рассчитанный по формуле (1).

Расчеты выполняют до второго десятичного знака.

Таблица 3 – Факторы разбавления

Виды продукции	Фактор разбавления
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное и восстановленное сухое молоко, восстановленное детское питание на основе сухого молока	1
Сухое молоко	10
Масло сливочное	5
Сыр	10

11.8 За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое результатов измерений параллельных проб $\bar{X}$ при выполнении условия повторяемости в соответствии с таблицей 2 и п. 13.2.1, которое рассчитывают по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (4)$$

где X_1, X_2 – результаты единичных измерений массовой доли афлатоксина M_1 в параллельных пробах образца, нг/кг, полученные при помощи ПО.

Окончательный результат измерений округляют до первого десятичного знака.

11.9 Регистрацию обработки промежуточных измерений проводят в журнале по форме, предусмотренной системой менеджмента лаборатории.

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результата измерения с использованием погрешности

Результаты измерения массовой доли афлатоксина M_1 представляют в следующем виде

$$(\bar{X} \pm 0,01 \cdot \delta \cdot \bar{X}) \text{ нг/кг,}$$

где $\bar{X}$ – результат измерений, полученный в соответствии с разделом 11;
 δ – значение показателя точности в соответствии с таблицей 1, %.

12.2 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием пределов измерения

Если величина массовой доли афлатоксина M_1 в пробе оказывается менее нижнего предела измерений настоящей методики, приведенного в таблице 1, то вычисление по формуле (4) не производится и дается односторонняя оценка массовой доли афлатоксина M_1 в образце в следующем виде

$$\text{менее } X_{LQ} \text{ нг/кг,}$$

где X_{LQ} – значение нижней границы диапазона измерений, нг/кг, приведенное в таблице 1.

13 Контроль погрешности результатов измерений

13.1 Периодичность проведения контроля погрешности измерений

Для контроля правильности выполнения измерений осуществляют процедуру внутреннего контроля качества результатов, полученных в соответствии с данной методикой. Внутренний контроль выполняют путем проведения оперативного контроля процедуры анализа и контроля стабильности результатов.

Оперативный контроль процедуры анализа проводится оператором с целью проверки готовности лаборатории к проведению анализа рабочих проб или оперативной проверки качества результатов анализа каждой серии рабочих проб, полученных совместно с результатами контрольных измерений.

Оперативный контроль проводят при:

- внедрении методики, при выявлении несоответствий;
- при появлении факторов, которые могут повлиять на стабильность процесса измерений (смена партии реактивов, использование средств измерений после ремонта и т.п.).

Контроль стабильности результатов анализа проводят с целью подтверждения лабораторией компетентности в обеспечении качества выдаваемых результатов анализа и оценки деятельности лаборатории в целом.

Организационные процедуры и периодичность внутреннего контроля качества результатов, полученных в соответствии с данной методикой, устанавливаются в соответствии с требованиями системы качества, принятой в лаборатории.

Ниже приводятся рекомендуемые процедуры проведения внутреннего контроля.

13.2 Проведение оперативного контроля процедуры анализа

13.2.1 Контроль повторяемости при реализации оперативного контроля процедуры анализа

Контроль повторяемости осуществляют для каждого образца из результатов измерений, получаемых в соответствии с методикой по 11.7.

Процедура контроля предусматривает сравнение абсолютного расхождения r_k между двумя результатами измерений X_1 и X_2 массовой доли афлатоксина M_1 , полученными на параллельных пробах каждого образца, с абсолютным значением предела повторяемости

$$r_k = |X_1 - X_2| \leq r \cdot 0,01 \cdot \bar{X}, \quad (5)$$

где r – относительное значение предела повторяемости, %, приведенное в таблице 2;

$\bar{X}$ – среднее арифметическое двух параллельных определений массовой доли афлатоксина M_1 в образце, рассчитываемое по формуле (4);

Если неравенство (5) выполняется, то результат контрольной процедуры признают удовлетворительным, а результаты измерений, полученные для параллельных проб, признают удовлетворяющими условию повторяемости. При этом окончательный результат измерений вычисляют в соответствии с 11.8.

Если неравенство (5) не выполняется, повторяют измерения по 9.4 – 11, а потом процедуру контроля повторяемости по п. 13.2.1. При повторном превышении предела повторяемости выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.2.2 Проведение оперативного контроля процедуры анализа с использованием контрольной процедуры для контроля погрешности с использованием образцов для контроля

Оперативный контроль процедуры анализа с использованием контрольной процедуры для контроля погрешности (КПКП) проводят в соответствии с [6] п. 5.5 с использованием образцов для контроля (ОК).

В качестве ОК используют образцы продукции с аттестованными значениями массовой доли афлатоксина M_1 , погрешность аттестации которых не должна превышать одной трети от характеристик погрешностей, представленных в таблице 1. Такими образцами могут быть стандартные образцы продукции (например, сухого молока) со значениями величины массовой доли афлатоксина M_1 , приготовленные и аттестованные, например, фирмой R-Biopharm (Германия) или другой организацией.

При реализации контрольной процедуры получают результат контрольного измерения массовой доли афлатоксина M_1 в стандартном образце X и сравнивают его с аттестованным значением массовой доли афлатоксина M_1 в этом образце C .

Результат контрольной процедуры K_k рассчитывают по формуле

$$K_k = |X - C|. \quad (6)$$

Норматив контроля K определяют как

$$K = 0,01 \cdot \delta \cdot \bar{X}, \quad (7)$$

где δ – характеристика погрешности результатов анализа, соответствующая значению массовой доли афлатоксина M_1 в образце для контроля и представленная в таблице 1, в виде относительной величины, %.

Проводят сопоставление результата контрольной процедуры с нормативом контроля. Результаты контрольной процедуры признают удовлетворительными при выполнении условия

$$|K_K| \leq K. \quad (8)$$

При невыполнении условия (8) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (8) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.2.3 Проведение оперативного контроля процедуры анализа с использованием контрольной процедуры для контроля погрешности с применением контрольной методики измерений

Оперативный контроль процедуры анализа с использованием КПКП проводят в соответствии с [6] п. 5.10 с применением контрольной методики измерений.

КПКП с применением контрольной методики измерений используют при наличии в лаборатории другой хорошо апробированной методики, при этом подлежит учету экономическая целесообразность применения данного способа.

Для представленной методики в качестве контрольной методики измерений может быть использована методика измерений массовой доли афлатоксина М₁ с помощью метода жидкостной хроматографии. Метод определения массовой доли афлатоксина М₁ в продуктах, основанный на жидкостной хроматографии, следует использовать в качестве контрольной методики измерений в таких случаях как:

- внедрение настоящей методики в практику лаборатории;
- в ситуации превышения установленного норматива массовой доли афлатоксина М₁ в продукции;
- разрешение спорных вопросов;
- смена оператора и т. п.

При использовании КПКП с применением контрольной методики измерений следует выполнять следующие условия:

а) диапазоны измерения представленной методики и контрольной методики измерений соответствуют друг другу и диапазону массовой доли определяемого микотоксина в рабочих пробах, анализируемых в лаборатории;

б) для контрольной методики измерений установлены значения характеристик погрешности результатов анализа при ее реализации в лаборатории, их значения должны быть меньше значений, представленных в таблице 1 данной методики.

При реализации контрольной процедуры получают в одинаковых условиях результаты контрольных измерений X и X_K одной и той же пробы по контролируемой (настоящей) методике и контрольной методике измерений, соответственно.

Результат контрольной процедуры K_K рассчитывают по формуле

$$K_K = X - X_K. \quad (9)$$

Норматив контроля K рассчитывают по формуле

$$K = \sqrt{(0,01 \cdot \delta_{L,\bar{X}} \cdot \bar{X})^2 + \Delta_{L,\bar{X}_K}^2}, \quad (10)$$

где $\delta_{L,\bar{X}}$ – характеристика погрешности результатов измерений при реализации контролируемой (настоящей) методики в лаборатории, соответствующая массовой доле афлатоксина М₁ в пробе, относительная величина, %, приведенная в таблице 1;

$\Delta_{L,\bar{X}_K}$ – характеристика погрешности результатов измерений при реализации контрольной методики измерений в лаборатории, соответствующая массовой доле афлатоксина М₁ в пробе, нг/кг.

Проводят сопоставление результата контрольной процедуры с нормативом контроля. Если результат контрольной процедуры удовлетворяет условию (8), процедуру признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (8) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (8) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.3 Контроль стабильности результатов анализа в форме периодической проверки подконтрольности процедуры выполнения анализа с применением образцов для контроля

Контроль стабильности результатов анализа в форме периодической проверки подконтрольности процедуры выполнения анализа с применением ОК проводят в соответствии с [6] раздел 7.

Выбирают образец для контроля в соответствии с п. 13.2.2.

Получают случайным образом в течение контролируемого периода L результатов контрольных измерений ОК $L \geq 5$. Каждый контрольный результат измерений $\bar{X}_l$ может быть получен как среднее арифметическое результатов параллельных определений, удовлетворяющих условию повторяемости по п. 13.2.1

Рассчитывают среднее арифметическое результатов контрольных измерений $\bar{\bar{X}}$, и их среднеквадратическое отклонение S_x и математическое ожидание (оценку) систематической погрешности лаборатории θ'_L (отклонение среднего значения от значения C образца для контроля) по формулам

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\sum_{l=1}^L \bar{X}_l}{L}, \quad (11)$$

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (\bar{X}_l - \bar{\bar{X}})^2}{L - 1}}, \quad (12)$$

$$\theta'_L = \bar{\bar{X}} - C, \quad (13)$$

где $\bar{X}_l$ – l -ый результат контрольного измерения массовой доли определяемого компонента в ОК.

Рассчитывают норматив контроля внутрилабораторной прецизионности $K_{ВП}$ для доверительной вероятности $P = 0,95$ по формуле

$$K_{ВП} = 0,01 \cdot \mu(f) \cdot \sigma_{R_L} \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (14)$$

где $f = L - 1$;

$\mu(f)$ – коэффициент, учитывающий ограниченность выборки (приведен в таблице 4);

σ_{R_L} – показатель внутрилабораторной воспроизводимости в виде относительного СКО, приведенный в таблице 1 для массовой доли афлатоксина M_1 , соответствующего массовой доли в ОК, %.

Таблица 4 – Коэффициент, учитывающий ограниченность выборки для доверительной вероятности $P = 0,95$

f	$\mu(f)$	f	$\mu(f)$
4	1,54	10	1,35
5	1,49	11	1,34
6	1,45	12	1,32
7	1,42	13	1,31
8	1,39	14	1,30
9	1,37	15	1,29

Рассчитывают норматив контроля правильности для доверительной вероятности $P = 0,95$ по формуле

$$K_{\Pi} = \sqrt{\frac{(t_{\text{табл}}(f) \cdot S_x)^2}{L} + (0,01 \cdot C \cdot \delta_{C,л})^2}, \quad (15)$$

где $t_{\text{табл}}(f)$ – квантиль t -распределения Стьюдента;
 $\delta_{C,л}$ – характеристика систематической погрешности лаборатории, выбираемая из таблицы 1, относительная величина, %.

Стабильность процесса анализа признают удовлетворительной, если выполняются следующие условия

$$S_x \leq K_{\text{ВП}} \text{ и } |\theta'_л| \leq K_{\Pi}. \quad (16)$$

Если полученные результаты не удовлетворяют условию (16), то выясняют и устраняют причины неудовлетворительного воспроизведения процедуры выполнения анализа.

Форма регистрации результатов контроля при периодической проверке подконтрольности процедуры выполнения анализа с использованием ОК приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Форма регистрации результатов контроля при периодической проверке подконтрольности процедуры выполнения анализа с применением ОК

Методика	Шифр ОК	Определяемый компонент	Аттестованное значение ОК, C	Результаты контрольных измерений $\bar{X}_i$	Среднее значение $\bar{X}$	СКО S_x	Норматив контроля внутри-лабораторной прецизионности $K_{\text{ВП}}$	Математическое ожидание (оценка) систематической погрешности лаборатории $\theta'_л$	Норматив контроля правильности K_{Π}	Выводы по результатам контроля

Приложение А
(справочное)
Метрологические характеристики средств измерений

Таблица А.1 – Метрологические характеристики секундомера

Наименование метрологической характеристики	Значение
Диапазон измерений интервалов времени в режиме секундомера, с	от 0,00 до 35999,9
Дискретность отсчета интервалов времени в режиме секундомера, с	0,01
Пределы допускаемой основной абсолютной погрешности измерения в режиме секундомера в нормальных условиях эксплуатации (25 ± 5) °С, с	$\pm(9,6 \cdot 10^{-6} \cdot T_x + 0,01)$
Пределы допускаемой дополнительной абсолютной погрешности измерения в режиме секундомера, вызванной отклонением температуры окружающего воздуха от нормальных условий (25 ± 5) °С в интервале рабочих температур от минус 10 °С до 50 °С на 1 °С изменения температуры, с	$\pm(2,2 \cdot 10^{-6} \cdot T_x)$
где T_x – значение измеренного интервала времени, с	

Таблица А.2 – Метрологические характеристики дозаторов

Диапазон показаний объемов дозирования, мм ³	Диапазон измерения объемов дозирования, мм ³	Номиналь-ный объем дозы, мм ³	Пределы допускаемого относительного отклонения сред-ного арифмети-ческого значения фактического объема дозы от номинального, %	Предел допуска-емого относитель-ного среднего квадратического отклонения факти-ческого объема дозы при доверительной вероятности P=0,95, %	Дискретность установки объема дозы, мм ³
Acura manual 825					
от 20,0 до 200,0	20,0	±2,0	3,0	0,2	
	100,0	±1,5	2,0		
	200,0	±1,5	2,0		
от 100 до 1000	100	±1,5	2,0	1	
	500	±1,0	1,0		
	1000	±1,0	1,0		
Acura manual 835					
от 1000 до 10000	1000	±2,0	1,0	10	
	5000	±1,1	1,0		
	10000	±1,0	1,0		

Приложение Б
(справочное)
Составы тест-систем

Таблица Б.1 – Состав тест-системы Ridascreen® Aflatoxin M1

Компонент тест-системы	Количество в комплекте, шт.
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами захвата)	1
Комплект градуировочных растворов афлатоксина М ₁ с концентрацией 0, 5, 10, 20, 40 и 80 нг/дм ³ , объем 1,3 см ³	6
Конъюгат, объем 11 см ³	1
Антитела, объем 11 см ³	1
Субстрат/хромоген, объем 10 см ³	1
Стоп-реагент, объем 14 см ³	1
Буфер для образцов, объем 60 см ³	1
Солевой промывочный буфер, пакет	1

Таблица Б.2 – Состав тест-системы ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1

Компонент тест-системы	Количество в комплекте, шт.
Иммуносорбент (микротитровальный планшет, 12 стрипов по 8 лунок, покрытых антителами захвата)	1
Комплект градуировочных растворов афлатоксина М ₁ с концентрацией 0, 5, 10, 20, 40 и 80 нг/дм ³ , объем 1,3 см ³	6
Конъюгат, объем 12 см ³	1
Антитела, объем 12 см ³	1
Хромоген-субстратный раствор, объем 14 см ³	1
Стоп-реагент, объем 14 см ³	1
Буфер 1 для разбавления проб, объем 60 см ³	1
Буфер 2 для разбавления проб, объем 40 см ³	1
Промывочный буфер, 10 – кратный концентрат, 100 см ³	1

Приложение В
(справочное)
Специфичность тест-систем

Таблица В.1 – Специфичность тест-системы Ridascreen® Aflatoxin M1

Микотоксин	Кросс реактивность, %
Афлатоксин М ₁	100
Афлатоксин М ₂	менее 10

Таблица В.2 – Специфичность тест-системы ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1

Микотоксин	Кросс реактивность, %
Афлатоксин М ₁	100
Афлатоксин М ₂	менее 10
Афлатоксин В ₁	менее 1
Афлатоксин В ₂	менее 1
Афлатоксин G ₁	менее 1
Афлатоксин G ₂	менее 1

Библиография

- [1] Положение о допуске единиц величин к применению в Республике Беларусь, утвержденное Постановлением Совета министров Республики Беларусь от 24.11.2020 № 673
- [2] РМГ 61-2010 ГСИ. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки
- [3] ТУ 2631-081-44493179-02 Метилен хлористый (дихлорметан)
- [4] ТУ 2631-158-44493179-13 н-Гексан (Гексан)
- [5] ТУ ВУ 100185129.201-2023 Тест-система для определения афлатоксина М1 в молоке и молочной продукции методом иммуноферментного анализа «ПРОДОСКРИН® ИФА-АФЛАТОКСИН М1»
- [6] РМГ 76-2014 ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

