

Общество с ограниченной ответственностью  
«ИЛ Тест-Пушино»

УТВЕРЖДАЮ  
Генеральный директор  
ООО «ИЛ Тест-Пушино»



Возняк В.М.

2015г.

**МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ МАССОВОЙ ДОЛИ МИКОТОКСИНОВ  
В ПРОБАХ ЗЕРНА, ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ И КОРМОВ  
МЕТОДОМ ПРЯМОГО КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО  
АНАЛИЗА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-НАБОРОВ «ТЕСТСИП»**

Московская область, г. Пушкино, 2015 г.

## **ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ**

### **РАЗРАБОТАНА**

Группой ИФА  
ООО «ИЛ Тест-Пушино»

### **АТТЕСТОВАНА**

ФГУП «ВНИИМС»  
Свидетельство об аттестации  
№ 01.00225/205-45-15  
от 6 ноября 2015 г.

### **ЗАРЕГИСТРИРОВАНА**

В Федеральном информационном  
фонде по обеспечению единства  
Измерений № ФР.1.31.2015.21799

## **1 Назначение и область применения**

Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее - МИ) массовой доли суммы афлатоксинов (В1, В2, G1и G2), зеараленона, суммы фумонизинов (В1 и В2), Т-2 токсина в пробах зерновых и масленичных культур продовольственного и кормового назначения, продукции мукомольно-крупяной промышленности, комбикормового сырья и кормов с кодами ОКПД [1], приведенными в таблице 1, прямым твердофазным конкурентным иммуноферментным методом (ИФА) с использованием тест-наборов «ТЕСТСИП».

Диапазоны измерений перечисленных микотоксинов представлены в таблице 1.

## **2 Нормативные ссылки**

В настоящей МИ использованы нормативные ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 28311-89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний.

ГОСТ OIML R 76-1-2011 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

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

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

ГОСТ Р 51568-99 Сита лабораторные из металлической проволоки. Технические условия.

ГОСТ 12.1.004-91 Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ Р 12.1.019-2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества.

ГОСТ 29224-91 Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения.

ГОСТ 13586.3-83 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.

ГОСТ 13496.0-80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб.

ГОСТ 29142-91 Семена масличных культур. Отбор проб.

ГОСТ Р ИСО 6497-2011 Корма для животных. Отбор проб.

ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

## 2 Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной МИ значение погрешности измерений (и ее составляющих) не превышает значений представленных в таблице 1.

Таблица 1

Объекты анализа	Диапазон измерений массовой доли микотоксина, млн <sup>-1</sup> , (мг/кг)	Показатель точности (границы относительной погрешности измерений) при P=0,95, ±δ, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ <sub>r</sub> , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости) σ <sub>R</sub> , %	Предел повторяемости, r, %, при P=0,95, n=2
<b>Сумма афлатоксинов (B1, B2, G1 и G2)</b>					
Рис <sup>1)</sup>	От 0,0020 до 0,020 включ.	26	7	11	19
Культуры зерновые, продукция мукомольно-крупяного производства <sup>2)</sup>	От 0,0020 до 0,020 включ.	32	10	15	28
Кукуруза <sup>3)</sup>	От 0,002 до 0,005 включ.	48	14	21	39
	Св. 0,005 до 0,020 включ.	25	7	11	19
Корма готовые для сельскохозяйственных животных <sup>4)</sup>	От 0,002 до 0,005 включ.	40	12	18	33
	Св. 0,005 до 0,020 включ.	32	4	6	11
Масленичные культуры, орехи <sup>5)</sup>	От 0,0020 до 0,020 включ.	26	8	12	22
<b>Зеараленон</b>					
Рис <sup>1)</sup>	От 0,04 до 1,0 включ.	30	6	9	17
Культуры зерновые, продукция мукомольно-крупяного производства <sup>2)</sup>	От 0,04 до 1,0 включ.	32	10	15	28
Кукуруза <sup>3)</sup>	От 0,04 до 1,0 включ.	50	15	23	42
Корма готовые для сельскохозяйственных животных <sup>4)</sup>	От 0,040 до 1,0 включ.	23	7	11	19
<b>Сумма фумонизинов (B1 и B2)</b>					
Кукуруза <sup>3)</sup>	От 0,25 до 1,0 включ.	33	8	12	22
	Св. 1,0 до 5 включ.	26	7	11	19
Корма готовые для сельскохозяйственных животных <sup>4)</sup>	От 0,25 до 1,0 включ.	42	11	16	30
	Св. 1,0 до 5 включ.	22	6	9	17
<b>T-2 токсин</b>					
Культуры зерновые, продукция мукомольно-крупяного производства <sup>2)</sup>	От 0,025 до 0,15 включ.	35	11	16	30
	Св. 0,15 до 0,50 включ.	18	3	5	8
Кукуруза <sup>3)</sup>	От 0,025 до 0,10 включ.	45	12	18	33
	Св. 0,10 до 0,5 включ.	23	4	8	11
Корма готовые для сельскохозяйственных животных <sup>4)</sup>	От 0,025 до 0,10 включ.	38	10	15	28
	Св. 0,10 до 0,5 включ.	20	6	9	17
Коды ОКПД (ОК 034-2014 (КПЕС 2008)): <ul style="list-style-type: none"> <li><sup>1)</sup> 01.12, 10.61.1;</li> <li><sup>2)</sup> 01.11.1, 0.1.11.3, 0.1.11.4, 10.61 (кроме риса)</li> <li><sup>3)</sup> 01.11.2, 01.19.10</li> </ul>					

## **4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам**

### **4.1 Средства измерений**

4.1.1 Фотометр для микропланшет модели 680 (№ 25454-03 в Госреестре СИ).

4.1.2 Весы лабораторные электронные ГОСТ OIML R 76-1, с наибольшим пределом взвешивания 310 г (№ 18785-00 в Госреестре СИ).

4.1.3 Дозаторы пипеточные одноканальные без воздушного промежутка с варьируемым объемом, номинальный объем дозы 100, 200, 500, 1000, 5000 мкл ГОСТ 28311.

4.1.4 Дозатор пипеточный Eppendorf Research Plus (№ 55543-13 в Госреестре СИ) восьмиканальный без воздушного промежутка с варьируемым объемом, номинальный объем дозы 300 мкл.

4.1.5 Цилиндры мерные 1-100-2, 1-1000-2 ГОСТ 1770.

4.1.6 Колба мерная 2-1000-2 ГОСТ 1770.

4.1.7 Пробирки стеклянные с притертой пробкой П-2-15-14/23 ГОСТ 1770-74.

### **4.2 Посуда, реактивы, вспомогательные устройства**

4.2.1 Колба П-2-250-29/32 ГОСТ 25336-82.

4.2.2 Воронка стеклянная коническая ВСП ХС ГОСТ 25336-82.

4.2.3 Пластиковые контейнеры для реагентов, изготовитель Thermo Fisher Scientific, Финляндия.

4.2.4 Наконечники OMNITIPS/UNITIPS для дозаторов вместимостью 200 мкл, 300 мкл, 1000 мкл, 5000 мкл, изготовитель ULPlast sp.zo.o., Польша.

4.2.6 Фильтры бумажные обеззоленные «синяя лента» ТУ 2642-001-68085491.

4.2.7 Вода дистиллированная ГОСТ 6709.

4.2.8 Метанол, квалификации «хч» ГОСТ 6995.

4.2.9 Мельница лабораторная Retsch, модель ZM 200, изготовитель RGmbH, Германия.

4.2.10 Сито с размером ячейки 20 меш. ГОСТ Р 51568-99.

4.2.11 Промыватель микропланшет Anthos Fluido 2, изготовитель Biochrom Ltd, Великобритания.

4.2.12 Пластиковые пробирки вместимостью 2,0 см<sup>3</sup> типа «Eppendorf», изготовитель SSI Inc, США.

### **4.3. Тест-наборы «ТЕСТСИП»**

4.3.1 Тест-набор «ТЕСТСИП» Афлатоксин (1 – 20 мкг/кг), состоящий из

- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами, запаянного в фольгированный пакет;
- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания, в прозрачном пакете;
- раствора конъюгата афлатоксин В1 – пероксидаза хрена (далее - конъюгат ) в пластиковом флаконе – 25 см<sup>3</sup>;
- субстрата в пластиковом флаконе – 15 мл;
- стоп-раствора в пластиковом флаконе – 15 мл;
- градуировочных растворов афлатоксина В1, приготовленных из стандартного образца производства фирмы BIOPURE (RM CAS number 1162-65-8, catalog number BRM 001012, массовая доля основного вещества не менее 98 %) и расфасованных по 1,5 см<sup>3</sup> в стеклянные флаконы из темного стекла - 6 флаконов. Метрологические характеристики градуировочных растворов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Номер градуировочного раствора	Аттестованное значение массовой концентрации афлатоксина В1, С <sub>i</sub> , мкг/см <sup>3</sup>	Массовая доля афлатоксина В1, * W, млн <sup>-1</sup> (W, мкг/кг )	Относительная погрешность, δ <sub>i</sub> , %
1	0	0	
2	0,0002	0,001 (1,00)	4
3	0,0004	0,002 (2,00)	4
4	0,0008	0,004 (4,00)	4
5	0,0020	0,01 (10,0)	4
6	0,0040	0,02 (20,0)	4
* Массовая доля афлатоксина В1 в пробе при массе навески 20 г, соответствующая массовой концентрации градуировочных растворов			

#### 4.3.2 Тест-набор «ТЕСТСИП» Зеараленон (40 – 1000 мкг/кг), состоящий из

- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами, запаянного в фольгированный пакет;
- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания, в прозрачном пакете;
- раствора конъюгата зеараленон – пероксидаза хрена (далее - конъюгат ) в пластиковом флаконе – 25 см<sup>3</sup>;
- субстрата в пластиковом флаконе – 15 мл;
- стоп-раствора в пластиковом флаконе – 15 мл;
- градуировочных растворов зеараленона, приготовленных из стандартного образца производства фирмы BIOPURE (RM CAS number 17924-92-4, catalog number BRM 001109, массовая

доля основного вещества не менее 99 %) и расфасованных по 1,5 см<sup>3</sup> в стеклянные флаконы из темного стекла - 5 флаконов. Метрологические характеристики градуировочных растворов приведены в табл. 3.

Таблица 3

Номер градуировочного раствора	Аттестованное значение массовой концентрации зеараленона, C <sub>i</sub> , мкг/см <sup>3</sup>	Массовая доля зеараленона,* W, млн <sup>-1</sup> (W, мкг/кг)	Относительная погрешность, δ <sub>i</sub> , %
1	0	0	
2	0,0016	0,04 (40)	3,6
3	0,0040	0,10 (100)	3,6
4	0,0120	0,30 (300)	3,3
5	0,0400	1,0 (1000)	3,6

\* Массовая доля зеараленона в пробе при массе навески 20 г и разбавлении экстракта в 5 раз, соответствующая массовой концентрации градуировочных растворов

#### 4.3.3 Тест-набор «ТЕСТСИП» Фумонизин (0,25 – 5 мг/кг), состоящий из

- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) с

иммобилизованными моноклональными антителами, запаянного в фольгированный пакет;

- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания, в

прозрачном пакете;

- раствора конъюгата фумонизин В1 – пероксидаза хрена (далее - конъюгат) в пластиковом флаконе – 25 см<sup>3</sup>;

- субстрата в пластиковом флаконе – 15 мл;

- стоп-раствора в пластиковом флаконе – 15 мл;

- градуировочных растворов фумонизина В1, приготовленных из стандартного

образца производства фирмы BIOPURE (RM CAS number 116355-83-0, catalog number BRM 001107, массовая доля основного вещества не менее 97 %) и расфасованных по 1,5 см<sup>3</sup> в стеклянные флаконы из темного стекла - 5 флаконов. Метрологические характеристики градуировочных растворов приведены в табл. 4.

Таблица 4

Номер градуировочного раствора	Аттестованное значение массовой концентрации фумонизина В1, C <sub>i</sub> , мкг/см <sup>3</sup>	Массовая доля фумонизина В1,* W, млн <sup>-1</sup> (W, мкг/кг)	Относительная погрешность, δ <sub>i</sub> , %
1	0	0	
2	0,0025	0,25 (250)	5
3	0,0100	1,00 (1000)	5
4	0,0250	2,50 (2500)	5

5	0,0500	5,00 (5000)	5
* Массовая доля фумонизина В1 в пробе при массе навески 20 г и разбавлении экстракта в 20 раз, соответствующая массовой концентрации градуировочных растворов			

4.3.4 Тест-набор «ТЕСТСИП» Т-2 токсин (25 – 500 мкг/кг), состоящий из

- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами, запаянного в фольгированный пакет;

- разборного 96-луночного планшета (12 стрипов по 8 лунок) для смешивания, в прозрачном пакете;

- раствора конъюгата Т-2 токсин – пероксидаза хрена (далее - конъюгат ) в пластиковом флаконе – 25 см<sup>3</sup>;

- субстрата в пластиковом флаконе – 15 мл;

- стоп-раствора в пластиковом флаконе – 15 мл;

- градуировочных растворов Т-2 токсина, приготовленных из стандартного

образца производства фирмы BIOPURE (RM CAS number 21259-20-1, catalog number BRM 001111, массовая доля основного вещества не менее 99 %) и расфасованных по 1,5 см<sup>3</sup> в стеклянные флаконы из темного стекла - 5 флаконов. Метрологические характеристики градуировочных растворов приведены в табл. 5.

Таблица 5

Номер градуировочного раствора	Аттестованное значение массовой концентрации Т-2 токсина, С <sub>i</sub> , мкг/см <sup>3</sup>	Массовая доля Т-2 токсина,* W, млн <sup>-1</sup> (W, мкг/кг )	Относительная погрешность, δ <sub>i</sub> , %
1	0	0	
2	0,0005	0,025 (25)	3,5
3	0,0020	0,100 (100)	3,3
4	0,0050	0,250 (250)	3,3
5	0,0100	0,500 (500)	3,3
* Массовая доля Т-2 токсина в пробе при массе навески 20 г и разбавлении экстракта в 10 раз, соответствующая массовой концентрации градуировочных растворов			

## 5 Метод измерений

Метод измерения массовой доли микотоксинов основан на принципе прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA). Микотоксины экстрагируют из размолотой пробы. Производят смешивание экстракта и конъюгата, полученную смесь вносят в лунки планшета с иммобилизованными моноклональными антителами. Свободные микотоксины из пробы и микотоксины, конъюгированные с ферментной меткой, конкурируют за ограниченное количество антител. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не связавшиеся с антителами микотоксины, в систему добавляют хромогенный субстрат, который позволяет визуализировать результаты реакции антиген-антитело. Затем добавляют стоп-раствор, останавливаю-



щий цветовую реакцию, и, одновременно, усиливающий окраску. Далее с помощью планшетного фотометра измеряют оптическую плотность содержимого лунок при 450 нм, которая обратно пропорциональна массовой концентрации микотоксинов в растворе. Содержание микотоксинов в образцах определяют с помощью градуировочных характеристик, которые устанавливают по аттестованным градуировочным растворам из тест-наборов «ТЕСТСИП».

## **6 Требования безопасности, охраны окружающей среды**

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79, а также требования, изложенные в технической документации на фотометр. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

## **7 Требования к квалификации оператора**

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное образование, прошедшего специальный инструктаж, освоившего метод в процессе обучения и получившего удовлетворительные результаты при оперативном контроле процедуры измерений.

## **8 Требования к условиям измерений**

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха  $20 \pm 5$  °С;
- атмосферное давление 84,0 – 106,7 кПа (630 – 800 мм.рт.ст);
- влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С;
- напряжение питания 198 ... 242 В;
- частота переменного тока  $50 \pm 1$  Гц.

## **9 Подготовка к выполнению измерений**

### **9.1 Отбор проб**

Отбор проб по ГОСТ 13496.0-80, ГОСТ 13586.3-83, ГОСТ 13979.0-86, ГОСТ 29142-91, ГОСТ Р ИСО 6497-2011.

### **9.2 Подготовка лабораторной посуды**

Подготовку стеклянной посуды проводят в соответствии с внутрिलाбораторными инструкциями по подготовке посуды.

### 9.3 Приготовление раствора метанола с объемной долей 70%

В мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 1000 см<sup>3</sup> вносят 700,0 см<sup>3</sup> метилового спирта, отмерянного цилиндром вместимостью 1000 см<sup>3</sup>. Доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают, закрывают пробкой.

### 9.4 Подготовка измерительного устройства

Подготовку фотометра для микропланшет к работе проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

### 9.5 Подготовка тест-наборов

Все реагенты и компоненты тест-набора перед проведением исследования должны достичь комнатной температуры (20 – 27°C). Для этого их распаковывают и оставляют прогреваться при комнатной температуре на рабочем столе не менее 45 минут.

### 9.6 Подготовка рабочего журнала

В рабочем журнале вычерчивают таблицу по образцу, приведенному ниже.

Таблица 6

№ лунки	№ градуировочного раствора (i, от 1 до m) или образца (j, от 1 до n)	Массовая концентрация (C <sub>i</sub> , мкг/см <sup>3</sup> )	Значение оптической плотности, (D <sub>i</sub> , ед)
	1		
	i		
	...		
	m		
	j		
	...		
	n		

## 10 Порядок выполнения измерений

### 10.1 Подготовка пробы

10.1.1 Пробу измельчают с использованием лабораторной мельницы так, чтобы 75 % массы проходило через сито с ячейкой 20 меш и тщательно гомогенизируют. Отбирают две навески массой (M) по 20,00 г и помещают каждую в чистую колбу объемом 250 см<sup>3</sup>. В каждую колбу добавляют мерным цилиндром 100 см<sup>3</sup> раствора метилового спирта с объемной долей 70 %. Перемешивают на встряхивателе не менее 40 минут. Полученные экстракты пропускают через бумажный складчатый фильтр «синяя лента» или аналогичный.

10.1.2 При определении фумонизинов, Т-2 токсина и зеараленона проводят разбавление экстрактов.

Экстракт пробы, предназначенной для определения фумонизинов, разводят в дистиллированной воде в соотношении 1:19, для чего в пластиковую пробирку вместимостью 2 см<sup>3</sup> вно-

сят 1,9 см<sup>3</sup> дистиллированной или деионизованной воды одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 5000 мкл, добавляют 100 мкл экстракта пробы одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 100 мкл и перемешивают.

Экстракт пробы, предназначенной для определения Т-2 токсина, разводят в дистиллированной воде в соотношении 1:9, для чего в пластиковую пробирку вместимостью 2 см<sup>3</sup> вносят 0,9 см<sup>3</sup> дистиллированной или деионизованной воды одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 1000 мкл, добавляют 100 мкл экстракта пробы одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 100 мкл и перемешивают.

Экстракт пробы, предназначенной для определения зеараленона, разводят в растворе метанола, приготовленного по 9.3, в соотношении 1:4, для чего в пластиковую пробирку вместимостью 2 см<sup>3</sup> вносят 0,4 см<sup>3</sup> раствора метанола одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 1000 мкл, добавляют 100 мкл экстракта пробы одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 100 мкл и перемешивают.

10.2 В лунки стрипа для смешивания, закреплённого в держателе для лунок, 8-канальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 300 мкл вносят по 200,0 мкл «конъюгата» из флакона с зеленой крышкой (поставляется в тест-наборах «ТЕСТСИП»). Для дозирования «конъюгата» рекомендуется использовать пластиковые контейнеры для реагентов. Затем, в эти же лунки, в соответствии с записями из таблицы 6, с помощью одноканального пипеточного дозатора с номинальным объемом 100 мкл вносят по 100,0 мкл каждого градуировочного раствора из тест-набора (флаконы из тёмного стекла) и экстрактов пробы, при этом необходимо производить смену наконечников дозатора после дозирования каждого раствора.

10.3 Используя восьмиканальный дозатор с номинальным объемом 300 мкл с новыми наконечниками трижды перемешивают содержимое лунок пипетированием и быстро переносят по 100 мкл содержимого каждой лунки для смешивания в соответствующую лунку стрипа с иммобилизованными антителами. Инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут.

10.4 Переворачивают планшет «вверх дном» для удаления жидкости из лунок, затем промывают лунки дистиллированной или деионизованной водой 4 раза. Перевернув и положив планшет на фильтровальную бумагу, окончательно удаляют из лунок остатки воды постукиванием.

10.5 После отмывки лунок вносят в них с помощью 8-канального дозатора с номинальным объемом 300 мкл с новыми наконечниками по 100,0 мкл хромогенного субстрата из флакона с синей крышкой с маркировкой «субстрат» (поставляется в тест-наборах «ТЕСТСИП») и оставляют для инкубирования при комнатной температуре в течение 5 минут.

10.6 С помощью 8-канального дозатора с номинальным объемом 300 мкл с новыми наконечниками отмеряют по 100,0 мкл стоп-раствора из флакона с красной крышкой с марки-

ровкой «стоп-раствор» (поставляется в тест-наборах «ТЕСТСИП») и вносят в лунки. При этом окраска растворов в лунках меняется с синего на желтый цвет.

10.6 Стрипы в держателе помещают в планшет фотометра, проводят измерение оптической плотности (D) при длине волны 450 нм. Полученные результаты заносят в журнал в соответствующую ячейку таблицы результатов.

10.7 Если значение оптической плотности экстракта меньше значения оптической плотности градуировочного раствора с максимальным содержанием микотоксина, экстракт разводят раствором метанола, приготовленного по 9.3, в 2 раза, для чего в пластиковую пробирку вместимостью 2 см<sup>3</sup> вносят 1,0 см<sup>3</sup> раствора метилового спирта одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 1000 мкл, добавляют 1,0 см<sup>3</sup> экстракта пробы одноканальным пипеточным дозатором с номинальным объемом 1000 мкл и перемешивают. Далее продолжают выполнять измерение в соответствии с 10.1.2 – 10.6.

## 11 Обработка и оформление результатов измерений

11.1 Для построения градуировочной характеристики используют данные анализа градуировочных растворов (D<sub>i</sub>).

Вычисляют значения  $\lg[D_i/D_1 - D_i]$  и  $\lg C_i$  для каждого градуировочного раствора, где D<sub>1</sub> – оптическая плотность градуировочного раствора, не содержащего микотоксинов.

Градуировочную характеристику аппроксимируют уравнением вида

$$y = a + b \cdot x \quad (1)$$

где  $y = \lg C$ ;  $x = \lg[D/D_1 - D]$

Коэффициенты градуировочного уравнения рассчитывают методом наименьших квадратов по уравнениям:

$$b = \frac{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i \cdot y_i - \sum_{i=1}^m x_i \cdot \sum_{i=1}^m y_i}{m \cdot \sum_{i=1}^m x_i^2 - (\sum_{i=1}^m x_i)^2} \quad (2)$$

$$a = \frac{\sum_{i=1}^m y_i - b \cdot \sum_{i=1}^m x_i}{m} \quad (3)$$

где  $m$  – число градуировочных растворов;  $m =$  от 5 до 6

Градуировочную характеристику признают приемлемой, если коэффициент корреляции (R) составляет не менее 0,985.

11.2 Стабильность градуировочной характеристики проверяют при каждом измерении. Градуировочную характеристику считают стабильной при выполнении для каждого градуировочного раствора условия

$$\frac{|C_{изм} - C_i|}{C_i} \cdot 100 \leq \delta_{зр} \quad (4)$$

где  $C_i$  – массовая концентрация афлатоксина В1 (зеараленона, Т-2 токсина, фумонизина В1) в  $i$ -ом градуировочном растворе, мкг/см<sup>3</sup>;

$C_{изм}$  – массовая концентрация афлатоксина В1 (зеараленона, Т-2 токсина, фумонизина В1) в  $i$ -ом градуировочном растворе, полученная по градуировочной характеристике, мкг/см<sup>3</sup>;

$\delta_{зр}$  – норматив контроля (погрешность градуировки);  $\delta_{зр} = 12\%$  для афлатоксина В1,  $11\%$  для зеараленона,  $15\%$  для фумонизина В1,  $10\%$  для Т-2 токсина.

11.3 По градуировочной характеристике вычисляют концентрацию микотоксинов в экстракте ( $C_m$ , мкг/см<sup>3</sup>)

$$C_m = 10^{b \cdot \lg[D/D_1 - D] + a} \quad (5)$$

11.4 Массовую долю микотоксинов в пробе ( $W$ , млн<sup>-1</sup> (мг/кг)) вычисляют по формуле

$$W = \frac{C_m \cdot V_э \cdot F \cdot f}{M} \quad (6)$$

$V_э$  – объем раствора, пошедшего на экстракцию, равный 100 см<sup>3</sup>,

$F$  – фактор разбавления экстракта, в соответствии с 10.1 при измерении содержания

- суммы афлатоксинов  $F=1$ ,

- зеараленона  $F=5$ ,

- Т-2 токсина  $F=10$ ,

- суммы фумонизинов  $F=20$

$M$  – масса навески пробы, г;  $M=20$

$f$  – коэффициент разбавления по 10.7,  $f=1, 2$

11.5 За результат измерения массовой доли микотоксинов в пробе ( $W$ , млн<sup>-1</sup> (мг/кг)) принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений  $W_1$  и  $W_2$ , полученных в условиях повторяемости:

$$\bar{W} = \frac{W_1 + W_2}{2} \quad (7)$$

если выполняется условие приемлемости:

$$|W_1 - W_2| \leq r \cdot 0,01 \cdot \bar{W}, \quad (8)$$

где  $r$  – значение предела повторяемости, % (таблица 1).

Результат вычисления округляют до второго десятичного знака.

11.6 Если условие (8) не выполняется, получают еще два результата параллельных определений в полном соответствии с методикой измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех параллельных определений, если выполняется условие:

$$|W_{\max} - W_{\min}| \leq CR_{0,95} \quad (9)$$

где  $W_{\max}$ ,  $W_{\min}$  – максимальное и минимальное, значение из полученных четырех результатов параллельных определений,  $\text{млн}^{-1}$  (мг/кг);

$CR_{0,95}$  – значение критического диапазона для уровня доверительной вероятности  $P = 0,95$  и  $n$  результатов определений, рассчитанное по формуле

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r \cdot 0,01 \quad (10)$$

где  $f(n)$  – коэффициент критического диапазона, для  $n = 4$   $f(n) = 3,6$ ;

$\sigma_r$  – показатель повторяемости, % (таблица 1).

Если условие (9) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений, в соответствии с требованиями настоящей методики измерений.

11.7 Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$\pm 0,01 \cdot \delta \cdot \text{при } P = 0,95 \quad (11)$$

где – среднее арифметическое значение результатов  $n$  параллельных определений, признанных приемлемыми,  $\text{млн}^{-1}$  (мг/кг);

$\delta$  – границы относительной погрешности измерений, % (таблица 1).

В случае, если массовая доля, например, суммы афлатоксинов (B1, B2, G1 и G2) ниже нижней (выше верхней) границы диапазона измерений, в документах производят следующую запись: «Массовая доля суммы афлатоксинов (B1, B2, G1 и G2) менее  $0,002 \text{ млн}^{-1}$  (мг/кг) (более  $0,020 \text{ млн}^{-1}$  (мг/кг))». Аналогичные записи производят для других микотоксинов в аналогичном случае в соответствии с диапазонами измерений, приведенными в таблице 1.

## 12 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИКИ В ЛАБОРАТОРИИ

Контроль качества результатов измерений в лаборатории при реализации методики проводят, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности рутинного анализа с изменяющимися факторами «время» и «оператор» по 6.2.3 ГОСТ Р ИСО 5725-6 и показателя правильности по 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6. Проверку стабильности выполняют с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории. Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

## **БИБЛИОГРАФИЯ**

[1] Общероссийский классификатор продукции по видам экономической деятельности. ОК 034-2014 (КПЕС 2008)