
МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
33601—
2015

МОЛОКО И МОЛОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ
Экспресс-метод определения афлатоксина М₁

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2016

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГБНУ «ВНИМИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 12 ноября 2015 г. № 82-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 ноября 2015 г. № 1946-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33601—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2016 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

МОЛОКО И МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ
Экспресс-метод определения афлатоксина M₁

Milk and milk products. Express method for determination of the aflatoxin M₁ content

Дата введения — 2016—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырое, термически обработанное и предварительно восстановленное сухое коровье молоко (далее — молоко) и устанавливает иммунохроматографический метод определения наличия афлатоксина M₁.

Предел обнаружения афлатоксина M₁ в продукте составляет 0,00002 мг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 26809.1—2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27752—88 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы определений

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29245—91 Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Отбор проб и подготовка их к анализу

Отбор проб и подготовка их к анализу — по ГОСТ 26809.1 и другим нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

В случае если определение не может быть проведено сразу после отбора проб, пробы хранят в холодильнике при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ не более суток.

4 Условия проведения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны соблюдаться следующие условия:

- температура окружающего воздуха $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха $(65 \pm 15) \%$;
- атмосферное давление $(96 \pm 10) \text{ кПа}$;
- частота переменного тока $(50 \pm 5) \text{ Гц}$;
- напряжение в сети $(220 \pm 10) \text{ В}$.

5 Определение афлатоксина M_1 с применением тест-набора «Aflasensor^{BT}»

Предел обнаружения афлатоксина M_1 в продукте составляет 0,00002 мг/кг.

5.1 Сущность метода

Метод основан на реакции комплексообразования афлатоксина M_1 со специфическими белковыми рецепторами, мечеными коллоидным золотом, и последующем визуальном выявлении оставшихся свободными меченых рецепторов методом хроматографии на индикаторных полосках хроматографической бумаги, содержащих в виде соответствующих линий реакционную и контрольную зоны.

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

5.2.1 Тест-набор¹⁾ для определения наличия афлатоксина M_1 , включающий:

- микропробирки, содержащие специфические белковые рецепторы, меченные коллоидным золотом, позволяющие определять афлатоксин M_1 ;
- индикаторные полоски для проведения хроматографического анализа;
- дозатор вместимостью $0,2 \text{ см}^3$ со стерильными наконечниками;
- флаконы для приготовления контрольных растворов: сухая смесь, содержащая афлатоксин M_1 массовой долей 0,0001 мг/кг («Положительный стандарт»), и сухая смесь, не содержащая афлатоксин M_1 («Отрицательный стандарт»).

5.2.2 Термометр лабораторный жидкостный, диапазоном измерения от $0 ^\circ\text{C}$ до $100 ^\circ\text{C}$ и ценой деления шкалы $1,0 ^\circ\text{C}$ по ГОСТ 28498.

5.2.3 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

5.2.4 Термостат, обеспечивающий поддержание температуры $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.2.5 Баня водяная термостатируемая, позволяющая поддерживать температуру от $0 ^\circ\text{C}$ до $100 ^\circ\text{C}$ с допустимой погрешностью $\pm 2 ^\circ\text{C}$.

5.2.6 Пипетка 1-1-1-1 по ГОСТ 29227.

5.2.7 Стакан В-1-250 ТС по ГОСТ 25336.

5.2.8 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

5.2.9 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

¹⁾ Тест-набор «Aflasensor^{BT}».

5.3 Подготовка к проведению измерений

5.3.1 Необходимое количество микропробирок со специфическими белковыми рецепторами тест-набора (5.2.1) выдерживают при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. После выдержки микропробирки со специфическими белковыми рецепторами тест-набора (5.2.1) помещают в термостат и термостатируют при температуре $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 10 мин.

5.3.2 Восстановление контрольных растворов «Положительный стандарт» и «Отрицательный стандарт» проводят следующим образом. Во флаконы, содержащие смеси для приготовления контрольных растворов (5.2.1), с помощью пипетки вносят по 1 см^3 дистиллированной воды. Флаконы закрывают крышками и оставляют на 1,5 мин. Затем содержимое флаконов аккуратно перемешивают до образования однородного раствора. Восстановленные контрольные растворы «Положительный стандарт» и «Отрицательный стандарт» используют свежеприготовленными.

5.3.3 Подготовка проб

Непосредственно перед измерениями проводят дополнительную подготовку проб: в стакан вместимостью 250 см^3 помещают $100\text{—}150\text{ см}^3$ продукта, подготовленного по разделу 3, пробу нагревают до температуры $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$, постоянно перемешивая, и охлаждают до температуры $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.

5.3.4 Восстановление сухого молока проводят по ГОСТ 29245, выдерживают время для набухания белка не менее 30 мин при комнатной температуре и далее пробу нагревают до температуры $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ и охлаждают до температуры $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.

5.4 Проведение измерений

5.4.1 Проводят два параллельных определения. В каждую микропробирку, подготовленную по 5.3.1, пипеткой с индивидуальным стерильным наконечником (5.2.1) вносят по $0,2\text{ см}^3$ пробы продукта, подготовленной по 5.3.3 и 5.3.4. Содержимое микропробирок быстро перемешивают, используя пипетку, наполняя и сливая ее содержимое обратно не менее пяти раз для получения однородного раствора.

5.4.2 Микропробирки помещают в термостат и выдерживают при температуре $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 3 мин. Затем в каждую микропробирку, не вынимая ее из термостата, помещают по одной индикаторной полоске (5.2.1). Микропробирки с индикаторными полосками выдерживают в термостате при температуре $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 7 мин.

По истечении этого времени индикаторные полоски извлекают из микропробирок, помещают на лист фильтровальной бумаги, отделяют от нее пористый фильтр и считывают результат не позднее чем через 2 мин, так как при подсушивании индикаторных полосок интенсивность окрашивания увеличивается, что может привести к ошибочному результату.

5.4.3 Параллельно проводят контрольное испытание, используя контрольные растворы, подготовленные по 5.3.2, в соответствии с 5.4.1—5.4.2. При этом в одну микропробирку вносят $0,2\text{ см}^3$ раствора «Положительный стандарт», в другую — $0,2\text{ см}^3$ раствора «Отрицательный стандарт».

5.5 Обработка результатов

5.5.1 Обработку результатов проводят, сравнивая интенсивность окрашивания зоны определения афлатоксина M_1 в красный цвет с контрольной линией контрольной зоны, проявившихся на индикаторной полоске после проведения измерений (приложение А, рисунок А.1). Результат считывают непосредственно после последнего термостатирования, но не позднее чем через 2 мин. Зона определения афлатоксина M_1 на индикаторной полоске расположена под контрольной линией.

Зона в верхней части индикаторной полоски является контрольной. Если после проведения определения по 5.4.2 или 5.4.3 окрашивания контрольной зоны не произошло, то определение афлатоксина M_1 в пробе повторяют с новым тест-набором, так как результат считается недействительным.

В случае если интенсивность окрашивания зоны определения афлатоксина M_1 более яркая, чем контрольная, проба считается отрицательной. Если интенсивность окрашивания зоны определения афлатоксина M_1 совпадает или менее яркая, чем контрольная, либо окрашивание зоны определения отсутствует, то проба считается положительной, что свидетельствует о наличии афлатоксина M_1 в анализируемом продукте в количестве, равном или большем, чем предел обнаружения.

5.5.2 Для проверки достоверной работы тестов проводят контрольные испытания согласно инструкции, прилагаемой к тест-набору. Обработку результатов в контрольном испытании с применением контрольных растворов «Положительный стандарт» и «Отрицательный стандарт» проводят по 5.5.1.

6 Определение афлатоксина М₁ в сыром молоке с применением тест-набора «Тест IDEXX SNAP® Афлатоксин М₁»

Предел обнаружения афлатоксина М₁ в продукте составляет 0,0005 мг/кг.

6.1 Сущность метода

Принцип действия основан на конкурентном, двусторонне направленном проточном иммуноферментном анализе. Метод основан на реакции комплексообразования афлатоксина М₁ со специфическим реагентом и последующем визуальном оценивании изменения окраски тестовых пятен.

6.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда и реактивы

6.2.1 Тест-набор¹⁾ для определения наличия афлатоксина М₁, включающий (приложение Б):

- SNAP®-тест;

- пробирку пластиковую, содержащую гранулы конъюгата — лиофилизированного реагента;

- пипетку пластиковую для переноса образца вместимостью 0,450 см³.

6.2.2 Термостат обеспечивающий поддержание температуры (45 ± 5) °С.

6.2.3 Устройство считывающее «Ридер IDEXX SNAPshot™ DSR».

6.2.4 Набор контрольных SNAP-тестов для считывающего устройства «Ридер SNAPshot™ DSR».

6.2.5 Стандарт Афлатоксина М₁ из *Aspergillus flavus* 5 мкг (кат. № А6428).

6.2.6 Часы электронно-механические по ГОСТ 27752.

6.2.7 Термометр лабораторный жидкостный, диапазоном измерения от 0 °С до 100 °С и ценой деления шкалы 1,0 °С по ГОСТ 28498.

6.2.8 Баня водяная термостатируемая.

6.2.9 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6.3 Подготовка к проведению измерений

6.3.1 Перед проведением измерений тест-набор (6.2.1) выдерживают при температуре (20 ± 5) °С в течение 20 мин. При этом в пробирке из тест-набора (6.2.1) гранула конъюгата должна находиться на дне. Если гранула конъюгата располагается не на дне, то необходимо, аккуратно постукивая по пробирке, вернуть гранулу на дно пробирки.

6.3.2 Термостат нагревают до температуры (45 ± 5) °С.

6.3.3 Непосредственно перед проведением измерений образцы продукта тщательно перемешивают и устанавливают температуру образца (20 ± 2) °С.

6.4 Проведение измерений

6.4.1 Используя пластиковую пипетку из тест-набора (6.2.1), в каждую пробирку из тест-набора (6.2.1), подготовленную по 6.3.1, вносят по (0,450 ± 0,050) см³ пробы молока, подготовленной по 6.3.3. Содержимое пробирок аккуратно перемешивают до растворения гранулы, используя пипетку, наполняя и сливая ее содержимое обратно пять раз.

6.4.2 Пробирки и тест из тест-набора (6.2.1) помещают в термостат и выдерживают при температуре (45 ± 5) °С в течение 2 мин.

6.4.3 Не вынимая тест из термостата, образец переливают в «Приемное окно» — специальную лунку на тесте и наблюдают за кружком активации.

¹⁾ Тест-набор «Тест IDEXX SNAP® Афлатоксин М₁».

6.4.4 Когда образец достигнет кружка активации (кружок активации начинает исчезать), тест необходимо активировать. Для этого нажимают на его край до щелчка и продолжают термостатировать при температуре (45 ± 5) °С в течение 7 мин.

6.4.5 Активировать тест из тест-набора (6.2.1) необходимо, когда кружок активации исчез наполовину. По истечении 7 мин и в течение последующих 30 с проводят считывание результатов анализа.

6.4.6 Параллельно проводят контрольное испытание, используя набор контрольных тестов (6.2.4), включая стандарт афлатоксина M_1 из *Aspergillus flavus* (6.2.5).

6.5 Обработка результатов

6.5.1 Считывание результатов проводят визуально либо при помощи считывающего устройства (6.2.3), способного численно определить степень затемнения тестовых пятен.

6.5.2 При визуальном считывании оценивают тестовое пятно. Если тестовое пятно светлее контрольного, то результат считается положительным. Если тестовое пятно, соответствующее образцу, темнее контрольного или такое же по цвету, то результат считается отрицательным.

6.5.3 При использовании считывающего устройства (6.2.3) по окончании термостатирования тест помещают в окно считывающего устройства.

Считывающее устройство (6.2.3) определяет степень затемнения тестовых пятен и отображает отношение значения степени затемнения тестового пятна, соответствующего контролю, к значению степени затемнения тестового пятна, соответствующего образцу (C/S).

6.5.4 Если значение отношения C/S больше 1,05, то содержание афлатоксина M_1 в анализируемой пробе продукта превышает значение ПДК, что соответствует содержанию афлатоксина M_1 более 0,0005 мг/кг.

6.6 Проверка чувствительности функционирования считывающего устройства

Проверку чувствительности функционирования считывающего устройства проводят в соответствии с инструкцией по использованию считывающего устройства, используя набор контрольных SNAP-тестов для считывающего устройства, поставляемых в комплекте со считывающим устройством.

Проверку чувствительности считывающего устройства рекомендуется проводить не реже одного раза в неделю.

7 Требования безопасности

При выполнении работ необходимо соблюдать следующие требования:

- помещение лаборатории должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005;

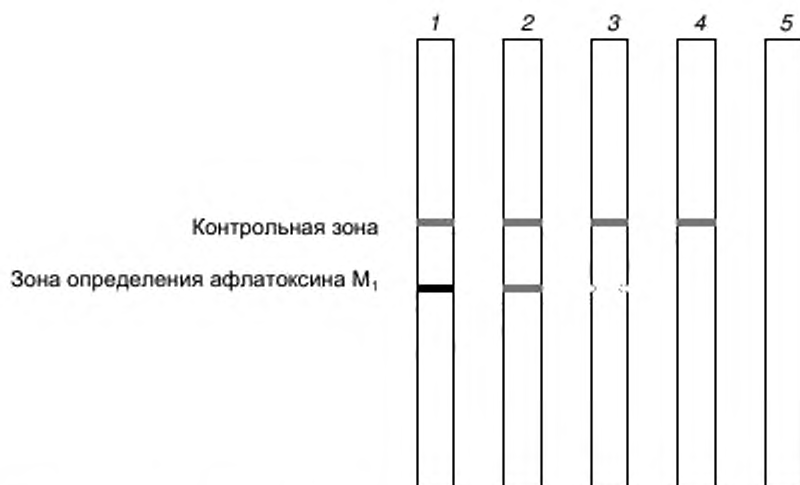
- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007;

- требования техники безопасности при работе с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

Приложение А
(справочное)Пример оценки результатов определения наличия афлатоксина М₁ с применением тест-набора «Aflasensor^{BT}»

А.1 Пример результатов определения наличия афлатоксина М₁ в анализируемом молоке с применением тест-набора «Aflasensor^{BT}» приведен на рисунке А.1.



1 — афлатоксин М₁ отсутствует; 2, 3, 4 — афлатоксин М₁ присутствует; 5 — недействительный результат

Рисунок А.1

Приложение Б
(справочное)Компонентный состав теста «IDEXX SNAP[®] Афлатоксин М₁»

Рисунок Б.1

Ключевые слова: молоко и молочные продукты, иммунохроматографический метод, метод определения наличия афлатоксина М₁, индикаторные полоски, контрольные тесты, предел обнаружения

Редактор *З.Ю. Белякова*
Корректор *П.М. Смирнов*
Компьютерная верстка *А.В. Балвановича*

Подписано в печать 15.02.2016. Формат 60x84^{1/8}.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 56 экз. Зак. 124.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru