

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Количественное определение остаточных
количеств бацитрацина в пищевой
продукции животного происхождения
методом конкурентного
иммуноферментного анализа**

Методические указания
МУК 4.1.3681—20

Издание официальное



Москва • 2022

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Количественное определение остаточных
количеств бацитрацина в пищевой продукции
животного происхождения методом
конкурентного иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3681—20**

ББК 51.23

К60

К60 **Количественное** определение остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022.—23 с.

ISBN 978–5–7508–1966–9

1. Разработаны ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (В. А. Тутельян, Д. Б. Никитюк, С. А. Хотимченко, С. А. Шевелева, Л. П. Минаева, В. В. Бессонов, А. Д. Малинkin, А. В. Галкин), ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора (Л. И. Иванова, А. Ю. Полторацкий).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 25 декабря 2020 г.

3. МУК 4.1.3681—20 введены взамен МУК 4.1.3379—16 «Определение остаточных количеств бацитрацина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа. Методические указания», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 08.07.2016 и главы III.1.A МУК 4.1.3535—18 «Определение остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 23.03.2018.

Свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 0266/РОСС RU.0001.310430/2022 от 07.02.2022 г., номер в реестре аттестованных методик ФР.1.31.2022.42674

ББК 51.23

ISBN 978–5–7508–1966–9

© Роспотребнадзор, 2022

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

А. Ю. Попова

25 декабря 2020 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Количественное определение остаточных количеств
бацитрацина в пищевой продукции животного
происхождения методом конкурентного
иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3681—20**

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) распространяются на продовольственное (пищевое) сырье и пищевую продукцию животного происхождения: молоко (сырое, питьевое, сухое), мясо (все виды), яйца (сырые, замороженные), рыбу и рыбные консервы, в том числе для детского питания.

МУК устанавливают порядок применения методики количественного определения остаточных количеств бацитрацина методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией (при 450 нм) (далее – ИФА) в соответствии с диапазонами определяемых концентраций и метрологическими характеристиками.

1.2. МУК предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также могут быть использованы организациями, аккредитованными в установленном порядке на проведение исследований продовольственного (пищевого) сырья, пищевых продуктов.

1.3. МУК носят рекомендательный характер.

II. Метод измерений

2.1. Метод иммуноферментного анализа основан на реакции «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты антителами к бацитрацину. В лунки вносят стандартные растворы бацитрацина и подготовленную пробу продукта, а затем конъюгат бацитрацина с ферментом, в результате происходит конкурентная реакция за центры связывания антител к бацитрацину между свободным бацитрацином и конъюгатом бацитрацина. Несвязавшийся конъюгат удаляется в процессе промывки. После добавления в лунки раствора субстрата/хромогена фермент в составе связавшегося с антителами к бацитрацину конъюгата взаимодействует с субстратом, превращая хромоген в вещество голубого цвета. Добавление стоп-реагента приводит к изменению цвета с голубого на желтый. Оптическую плотность прореагировавшей смеси измеряют фотометрически при 450 нм. По результатам измерения судят о количестве бацитрацина в исследуемой пробе (величина оптической плотности раствора обратно пропорциональна концентрации бацитрацина в исследуемой пробе продукта). Расчёт содержания бацитрацина проводят по стандартной кривой или с помощью программного обеспечения.

III. Метрологические характеристики

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

Метрологические параметры установлены при проведении количественного определения с тест-набором, указанным в главе IV. Допускается использование метода для тест-наборов с аналогичными или лучшими характеристиками при наличии установленных метрологических параметров.

Таблица 3.1

Значения характеристики погрешности, нормативов оперативного контроля точности, повторяемости, воспроизводимости, полнота извлечения бацитрацина¹

Анализируемый объект	Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг (мг/дм ³)	Показатель точности (границы относительно погрешности), $\pm\delta$, % $P = 0,95$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторности), σ_r , %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R , %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r , %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между результатами измерений, полученными в разных лабораториях), R , % ($P = 0,95$)	Средняя полнота извлечения вещества, %
Молоко	0,011—0,202	41	4,9	6,9	14	19	99
Мясо скота и птицы	0,009—0,246	47	8,2	11,5	23	32	122
Яйца (сырые, замороженные)	0,011—0,273	48	9,0	12,6	25	35	110
Рыба	0,009—0,273	54	5,0	7,0	14	20	110
Рыбные консервы, в том числе для детского питания	0,009—0,273	50	5,4	7,6	15	21	99

IV. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

4.1. При выполнении измерений и подготовке проб применяют средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы, приведенные в табл. 4.1—4.4.

¹ Пример метрологических характеристик при использовании тест-набора «RIDASCREEN Bacitracin».

Средства измерений

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с переменными объемами от 0,005 до 0,050 см ³ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более $\pm(5,0 \div 2)$ %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с переменными объемами от 0,02 до 0,2 см ³ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более $\pm(2,0 \div 1,5)$ %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с переменными объемами от 0,1 до 1 см ³ с относительной погрешностью дозирования не более $\pm(1,5 \div 1,0)$ %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с переменными объемами от 1 до 5 см ³ с относительной погрешностью дозирования не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Автоматические пипеточные дозаторы 8-канальные с переменным объемом 0,05—0,3 см ³ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более $\pm(2,0 \div 1,5)$ %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Фотометр вертикального типа – планшетный иммуноферментный анализатор с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и длиной волны 450 нм	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА	—
pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH $\pm 0,01$ (не более)	Внесено в реестр «Утвержденные типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений

Продолжение табл. 4.1

1	2
Цилиндры мерные вместимостью 50, 250 см ³	ГОСТ 1770
Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 100 и 250 см ³	ГОСТ 1770
Пипетки (с делениями) ³ 2-го класса точности объемом 1, 2, 5 и 10 см ³	ГОСТ 29227 (ИСО 835-1)

Примечание. Допускается использование других средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

Таблица 4.2

Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Наименование вспомогательного оборудования, устройств, материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$	—
Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	—
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов) или фарфоровые ступки с пестиками	—
Колбы конические на 50 и 100 см ³ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932
Магнитная мешалка	—
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,050; 0,300; 1,000; 5,000 см ³ однократного применения	—
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 см ³	—
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 см ³	—
Пробирки полипропиленовые по типу «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 см ³	—
Стаканы химические вместимостью 50, 100, 250 см ³	ГОСТ 25336
Устройство для отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микроювету, от 0,1 см ³ до 0,350 см ³ (при наличии)	—

Продолжение табл. 4.2

1	2
Холодильник бытовой электрический	—
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS) ² до 4000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	—
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS) до 20 000 g	—
Шейкер для пробирок вихревого типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 100 об./мин	—
Шейкер (смеситель) переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости до 100 об./мин	—
Шкаф (стол) лабораторный	—
Шпатели или палочки стеклянные	—

Примечание. Допускается использование других вспомогательных устройств, посуды и материалов с аналогичными или лучшими характеристиками.

Таблица 4.3

Реактивы

Наименование реактивов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
н-Гексан	Содержание основного вещества не менее 99,85 %
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Натрия гидроксид (NaOH), хч	ГОСТ 4328
Натрий хлористый (HCl), хч	ГОСТ 4233
Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), хч	ГОСТ 4172
Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), хч	ГОСТ 245
Янтарная кислота, хч	—

Примечание. Допускается применение других химических реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

² Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в приложении к настоящим МУК.

4.2. Количественное определение бацитрацина по технологии ИФА проводят с тест-набором с внутренним стандартом, рассчитанным на проведение анализа 41 исследуемого образца и 7 калибровочных проб (в 2 повторностях), в составе (таблица 4.4).

Таблица 4.4

Пример состава тест-набора³

Наименование вспомогательного оборудования, устройств, материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), покрытый антителами к бацитрацину, в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем	Инструкция к набору
2. Комплект стандартных растворов бацитрацина в воде (по 1 см ³ каждый, нулевой стандарт – 2 см ³) с концентрациями: 0 (нулевой стандарт); 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 мкг/дм ³ бацитрацина в воде	Инструкция к набору
3. Конъюгат бацитрацина с пероксидазой, концентрат (×100) (0,1 см ³)	Инструкция к набору
4. Буфер для конъюгата, готовый к использованию (15 см ³)	Инструкция к набору
5. Готовая смесь субстрата с хромогеном (12 см ³)	Инструкция к набору
6. Буфер для разбавления проб, готовый к использованию (40 см ³)	Инструкция к набору
7. Буфер для промывки, концентрат (×20) (30 см ³)	Инструкция к набору
8. Стоп-реагент, содержащий раствор 1 н серной кислоты (14 см ³)	Инструкция к набору

Пример специфичности методики определения бацитрацина, установленной по перекрестной чувствительности к исследованным антибиотикам в буферной системе с тест-набором, представлен в табл. 4.5.

Таблица 4.5

Пример специфичности тест-набора⁴

Вещество	Специфичность, %
Бацитрацин (вещество калибровочного стандарта)	100
Виргиниамицин	< 3
Тилозин	< 2
Спирамицин	< 1
Неомицин	< 1
Колистин	< 1

³ Тест-набор «RIDASCREEN Bacitracin».

⁴ Тест-набор «RIDASCREEN Bacitracin».

V. Требования безопасности

5.1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

5.2. Проведение исследований допускается только в подготовленном лабораторном помещении.

5.3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, отвечать требованиям пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения в соответствии с ГОСТ 12.4.009.

5.4. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ 12.1.019 и инструкцию по эксплуатации прибора.

5.5. При работе с тест-набором необходимо соблюдать следующие требования безопасности:

- стоп-реагент содержит 0,5 М серной кислоты. Не допускается попадание реагента на кожу;
- раствор субстрат-хромогена токсичен при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании. При обращении необходимо соблюдать меры предосторожности;
- необходимо избегать контакта всех реагентов с кожей и слизистыми оболочками;
- при дозировании реагентов допускается использовать только указанные инструменты.

VI. Требования к квалификации операторов

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

VII. Отбор проб

7.1. Отбор проб осуществляют в соответствии с методическим документом⁵.

⁵ МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

7.2. Пробы исследуемых продуктов хранят в соответствии с рекомендациями изготовителя, указанными в сопроводительной документации или на этикетке.

7.3. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 1 суток.

Допускается транспортирование материала при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

VIII. Условия проведения измерений

8.1. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

IX. Подготовка к выполнению измерений

9.1. Подготовка стеклянной посуды.

При подготовке к проведению исследований лабораторную стеклянную посуду моют смесь водного раствора бихромата калия с концентрированной серной кислотой, многократно промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу.

9.2. Подготовка оборудования.

Подготовку и проверку фотометра, рН-метра и другого необходимого оборудования проводят в соответствии с руководствами по эксплуатации приборов.

9.3. Хранение и использование наборов и реагентов.

Тест-наборы для ИФА хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С, не допуская подмораживания компонентов. Использовать набор допускается только в пределах срока годности.

При подготовке к анализу ИФА, использованию и хранению тест-набора при необходимости дополнительно руководствоваться инструкцией к тест-набору.

9.4. Приготовление растворов.

9.4.1. Приготовление 80%-го раствор метанола.

Для приготовления 80%-го раствора метанола в буфере для разбавления проб (входит в комплект набора) в количестве, необходимом для

экстракции, смешивают метанол и буфер в соотношении 4+1 (например, к 8 см³ метанола прибавляют 2 см³ буфера для разбавления проб, данный объём достаточен для экстракции 5 проб). Раствор тщательно перемешивают.

Растворы метанола готовят в необходимом для анализа количестве непосредственно перед использованием с соблюдением указанных соотношений компонентов. Остатки хранению не подлежат и утилизируются в соответствии с установленными правилами.

9.4.2. Приготовление моющего буферного раствора.

Для приготовления буфера для промывки разбавляют исходный концентрированный раствор буфера в соотношении 1 : 20 (1 + 19) дистиллированной водой (например, к 2 см³ концентрата прибавляют 38 см³ дистиллированной воды). Раствор тщательно перемешивают.

Разбавленный буфер для промывки готовят в необходимом для анализа количестве непосредственно перед использованием с соблюдением указанных соотношений компонентов. Например, 40 см³ разведенного раствора буфера для промывки достаточно для 4 микротитровальных стрипов по 8 лунок в каждом. Остатки хранению не подлежат и утилизируются в соответствии с установленными правилами.

9.4.3. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия (для нейтрализации образцов).

Навеску 5,0 г гидроокиси натрия разводят в мерной колбе объемом 250 см³ дистиллированной водой до метки. Раствор тщательно перемешивают.

Раствор гидроокиси натрия хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре с плотно закрытой полиэтиленовой /полипропиленовой или резиновой крышкой в течение 2—3 недель.

Примечание. При приготовлении разведений необходимо учитывать следующее: соотношение 1 : 10 означает, что 1 часть вещества (экстракта, концентрата) содержится в 10 частях готового раствора, то есть к 1 части вещества (экстракта, концентрата) прибавляется 9 частей растворителя, в соответствии с инструкцией производителя тест-набора.

Принимается допущение, что плотность буферных и других растворов (солей, кислот и щелочей), экстрактов, используемых в приведенных методиках, а также 10%-х растворов (суспензий) продуктов приравнивается к плотности воды, исходя из чего при приготовлении последующих разведений учитывать, что массовые (м/м) и объемные (о/о) проценты принимаются равными.

9.5. Подготовка проб продуктов.

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документацией на продукт). При отсутствии информации 1,0 г сухого продукта суспендируют в 9,0 см³ дистиллированной воды. Пробы при необходимости нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроксиды (п. 9.4.3), доводя уровень pH до $7,0 \pm 0,5$.

9.5.1. Молоко (сырое, питьевое, сухое).

Образец молока (жидкого или восстановленного) отбирают по 5—10 см³ в центрифужную пробирку объемом 15 см³, центрифугируют в течение 5 мин при 2000 г и температуре не выше 4 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры не выше 4 °С в течение 20—30 мин).

Образовавшийся верхний слой жира удаляют с помощью шпателя или стеклянной палочки, обезжиренный супернатант разбавляют в соотношении 1 : 10 (1 + 9) буфером для разбавления проб (в комплекте набора) (например, к 0,02 см³ обезжиренного супернатанта добавляют 0,18 см³ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе.

Для дальнейшего анализа используют по 0,05 см³ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10, для сухих продуктов дополнительно учитывают коэффициент восстановления.

9.5.2. Мясо (скота и птицы), яйца, рыба, рыбные консервы, в том числе для детского питания.

Полностью гомогенизируют всё количество представительной пробы в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Навеску 1 г гомогенизированной пробы вносят в центрифужную пробирку объемом 15 см³, добавляют 2 см³ 80%-го раствора метанола в буфере (п. 9.4.1) для проб, перемешивают встряхиванием в течение 15 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом), центрифугируют при 2000 г в течение 10 мин при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С), супернатант отбирают в пустую пробирку.

Супернатант разбавляют в соотношении 1 : 5 (1 + 4) буфером для разбавления проб (в комплекте набора) (например, к 0,04 см³ супернатанта добавляют 0,16 см³ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе.

Для анализа вносят по 0,05 см³ подготовленного экстракта в лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 15.

Х. Проведение измерений

10.1. Раствор субстрата/хромогена светочувствителен, поэтому необходимо избегать попадания на него прямого света. При появлении окрашивания раствора субстрата/хромогена в голубоватый цвет реагент к работе непригоден.

Не допускается заменять реагенты в составе одного комплекта реагентами из другого комплекта с другим номером партии. Не допускается перекрестное использование реагентов из комплектов с разными номерами партий.

Каждая лунка стрипа при изменении оптической плотности выступает в роли оптической кюветы, поэтому необходимо избегать прикосновения и загрязнения нижней стороны лунок.

10.2. Подготовка тест-набора к исследованиям.

10.2.1. Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов (8 микролунок, скрепленных в одну полосу). Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить в холодильник при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

10.2.2. Перед использованием тест-набора доводят температуру всех реагентов до комнатной (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение 0,5—1 ч. Если в концентратах буфера и конъюгата образовались кристаллы, нужно растворить их путём встряхивания при комнатной температуре перед разведением этих реагентов.

10.2.3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

10.2.4. После использования реагенты тест-набора сразу убирают в холодильник.

10.2.5. На всех стадиях необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

10.2.6. Для каждого реактива и раствора используют отдельные съемные наконечники автоматических дозаторов. Внесение растворов в лунки проводят осторожно, не касаясь наконечниками их дна и стенок.

10.2.7. Для получения точных результатов на стадиях дозирования реактивов и промывания необходимо соблюдать высокую точность и аккуратность.

10.2.8. Каждый исследуемый раствор экстрактов испытуемых проб и градуировочных растворов анализируют в двух повторностях.

10.2.9. Оптимальные результаты будут получены только при строгом соблюдении приведенной методики.

10.3. Подготовка реагентов к исследованиям.

10.3.1. Приготовление раствора со 100-кратным разведением из концентрата конъюгата должно проводиться автоматическим дозатором с диапазоном дозирования от 0,005 до 0,050 см³, обеспечивающим строгий количественный отбор концентрата конъюгата. После внесения в буфер для разбавления необходимо провести тщательное перемешивание путем многократного пипетирования, не меняя наконечника.

Проверка используемых автоматических дозаторов на точность и сходимость результатов пипетирования должна проводиться еженедельно (например, весовым методом), допустимая относительная погрешность дозирования не должна превышать установленного в паспорте значения.

Допускается дополнительно контролировать отбираемый объем концентрата с использованием аналитических весов с наименьшим пределом взвешивания не более 0,0001 г.

Ферментный конъюгат бацитрацина поставляется в концентрированном виде. Так как разбавленный раствор конъюгата обладает ограниченной стабильностью, то перед исследованием необходимо восстанавливать строго то количество, которое необходимо для анализа.

Пробирку с конъюгатом центрифугируют в течение короткого периода времени – 1 мин при 1000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С). Для восстановления разбавляют концентрат в соотношении 1 : 100 (1 + 99) буфером для конъюгата (п. 9.4.1) (например, 0,020 см³ концентрата антител + 1,980 см³ буфера для конъюгата. Такого количества достаточно на 4 стрипа, т. е. 32 лунки).

10.4. Алгоритм проведения исследования.

10.4.1. В рамку планшета вставляют необходимое количество микролунок, достаточное для всех растворов стандартов и растворов исследуемых проб при анализе в двух повторностях каждый. Записывают положение лунок со стандартами и исследуемыми растворами на бланке планшета.

10.4.2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 см³ каждой концентрации раствора стандарта или раствора подготовленной пробы продукта, после чего в каждую лунку добавляют по 0,05 см³ разбавленного конъюгата (п. 10.3.1). Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение 1 часа в темном месте.

10.4.3. По окончании инкубации выливают жидкость из лунок, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамкой с лунками по столу (максимально выбивая капли из лунок), накрытому фильтровальной бумагой.

10.4.4. Заполняют лунки буфером для промывки, подготовленным по п. 9.4.2, внося по $0,3 \text{ см}^3$ в каждую лунку, используя восьмиканальный дозатор. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, после чего выливают жидкость из лунок и тщательно выбивают капельки жидкости из лунок, как описано выше в п. 10.4.3. Процедура отмывки повторяется трижды.

Допускается для увеличения производительности использование автоматического устройства для отмывки иммунологических планшетов.

Примечание. Необходимо следовать рекомендованной процедуре промывки и не допускать высыхания микролунок в процессе выполнения анализа.

10.5. После отмывания добавляют по $0,1 \text{ см}^3$ смеси субстрата/хромогена в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс $25 \text{ }^\circ\text{C}$) в течение 30 минут в темном месте.

10.6. По окончании инкубации добавляют в каждую лунку по $0,1 \text{ см}^3$ стоп-реагента. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и сразу после этого измеряют оптическую плотность в каждой лунке, время от внесения стоп-реагента до измерения не должно превышать 30 мин.

XI. Обработка результатов измерений

11.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на микропланшетном иммуноферментном анализаторе (планшетный фотометр, ридер) при длине волны 450 нм против нулевого стандарта, значение которого принимается за 100 %.

Величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,6 ($A_{450\text{нм}} < 0,6$) является признаком порчи реагентов. Окрашивание красноватого раствора субстрата/хромогена в голубой цвет перед постановкой анализа также является признаком порчи реагентов. Результаты анализа в таком случае не учитываются.

11.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа используется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-набора. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-набор.

Программное обеспечение выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B_0 от натурального логарифма концентрации антибиотика:

$$B_i/B_0 = a + b \cdot \ln C_i, \text{ где} \quad (1)$$

B_i – оптическая плотность раствора антибиотика;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией антибиотика $0,00 \text{ мкг/дм}^3$;

C_i – концентрация антибиотика в i -ом градуировочном растворе, мкг/дм^3 (нг/см^3).

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B_i/B_0 , $\ln C_i$, полученных для шести градуировочных растворов, где ($I = 2 \dots 7$), C – концентрация i -го градуировочного раствора, B_i – среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям оптической плотности параллельных измерений i -го градуировочного раствора. Массовая концентрация антибиотика в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле:

$$X = F \cdot \exp \left(\frac{B_x / B_{0-a}}{b} \right), \text{ где} \quad (2)$$

X – концентрация антибиотика в пробе, мкг/кг (мкг/дм^3) (нг/г или нг/см^3);

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы (экстракта);

F – фактор разбавления пробы.

Градуировочная зависимость считается приемлемой, если рассчитанное программным обеспечением значение коэффициента корреляции $r^2 > 0,98$.

11.3. Обработку результатов анализа без программного обеспечения проводят следующим образом.

Измеренные показатели оптической плотности переносят в таблицу и располагают в соответствии с номерами образцов.

Вычисляют средние значения оптической плотности стандартных и исследуемых растворов, полученные по 2 параллельным микролункам в результате двух параллельных определений.

Относительную оптическую плотность (A) вычисляют по формуле:

$$A = \frac{B_t}{B_0} \cdot 100, \text{ где} \quad (3)$$

A – значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения;

B_i – среднее значение оптической плотности шести стандартных растворов антибиотика ($i = 2...7$) (или исследуемых экстрактов испытуемых проб);

B_o – среднее значение оптической плотности 1-го градуировочного раствора (нулевого стандарта).

11.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим им значениям концентрации антибиотика в мкг/дм^3 , строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

11.5. Концентрацию антибиотика (x) в мкг/дм^3 в экстракте испытуемой пробы считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности (в пределах значений 2÷7 градуировочных растворов), которые вычислены по формуле (3).

11.6. Массовую концентрацию (содержание) антибиотика в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{F \cdot x}{K}, \text{ где} \quad (4)$$

X – массовая концентрация антибиотика в испытуемой пробе, мг/кг (мг/дм^3 – для жидких продуктов);

x – массовая концентрация антибиотика в экстракте испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, мкг/дм^3 ;

F – фактор разбавления испытуемой пробы;

K – коэффициент пересчета мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1000.

При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления F принимает следующие значения (табл. 11.1)

Таблица 11.1

**Факторы разбавления для расчета содержания бацитрацина
в различных пробах**

Образец	Фактор разбавления
Молоко	10
Мясо скота и птицы	15
Яйца (сырые, замороженные)	15
Рыба и рыбные консервы, в том числе для детского питания	15

ХII. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

12.1. При расчёте учитывают только результаты, удовлетворяющие условиям диапазона определяемых концентраций антибиотика в образце (значение равно или выше нижней границы / равно или ниже верхней границы) для соответствующего вида продукции, указанного в таблице 3.1 для каждой группы продуктов.

В случае обнаружения содержания антибиотика в подготовленном экстракте выше верхней границы градуировочного графика проводят дополнительное разведение подготовленного экстракта и в дальнейшем учитывают это разведение при обработке результата анализа.

За результат количественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений \bar{X} , расхождение между которыми не превышает предела повторяемости:

$$\bar{X} = \frac{2 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2} \cdot 100 \leq r, \text{ где} \quad (5)$$

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;

r – значение предела повторяемости (табл. 3.1), при этом $r = 2,8\sigma$.

При невыполнении условия выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

ХIII. Оформление результатов

13.1. Результат анализа представляют в виде:

$(\bar{X} \pm \Delta)$ мг/кг при вероятности $P = 0,95$, где

\bar{X} – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \bar{X}}{100}, \text{ где} \quad (6)$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 3.1), %.

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, с учетом границы абсолютной погрешности результат анализа представляют в виде: «Содержание бацитрацина в мясе $< 0,009$ мг/кг».

ХIV. Контроль качества результатов измерений

14.1. Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости) и воспроизводимости, проводят с учетом ГОСТ ИСО 5725-6.

Пересчет относительного центробежного ускорения в скорость центрифугирования

Различные модели центрифуг при одинаковых скоростях вращения ротора могут иметь отличающиеся факторы разделения, поэтому эффективность разделения в центробежном поле принято количественно оценивать как величину относительного центробежного ускорения (ОЦУ /RFS), выраженную в единицах g.

Эффективность разделения – фактор разделения F (ОЦУ /RFS) – зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования и рассчитывается по следующей формуле:

$$F = 11,18 \cdot r \cdot (n^2/1000)^2, \text{ где} \quad (1),$$

n – скорость вращения ротора, об/мин;

r – средний радиус вращения столбика жидкости в центрифужной пробирке, см.

Радиус измеряется от оси вращения ротора до середины столбика жидкости в пробирке, когда держатель пробирки (при наличии подвижного держателя) находится в положении центрифугирования (под углом к оси вращения).

Если необходимо обеспечить заданный фактор разделения, то для расчета скорости центрифугирования используют следующую формулу:

$$n = 1000 \cdot \sqrt{\frac{F}{11,18 \cdot r}} \quad (2)$$

Для облегчения расчета можно использовать номограмму, отражающую зависимость относительного ускорения центрифуги (ОЦУ /RFS) от скорости вращения ротора (n) и радиуса (r) – среднего радиуса вращения столбика жидкости в центрифужной пробирке.

Пример.

Необходимо определить скорость вращения центрифуги для достижения относительного центробежного ускорения (фактора разделения) 4000 g, если средний радиус вращения столбика жидкости в центрифужной пробирке равен 8 см.

Способ 1 – путем расчета по формуле (2):

$$n = 1000 \cdot \sqrt{\frac{4000}{11,18 \cdot 8}} = 6687$$

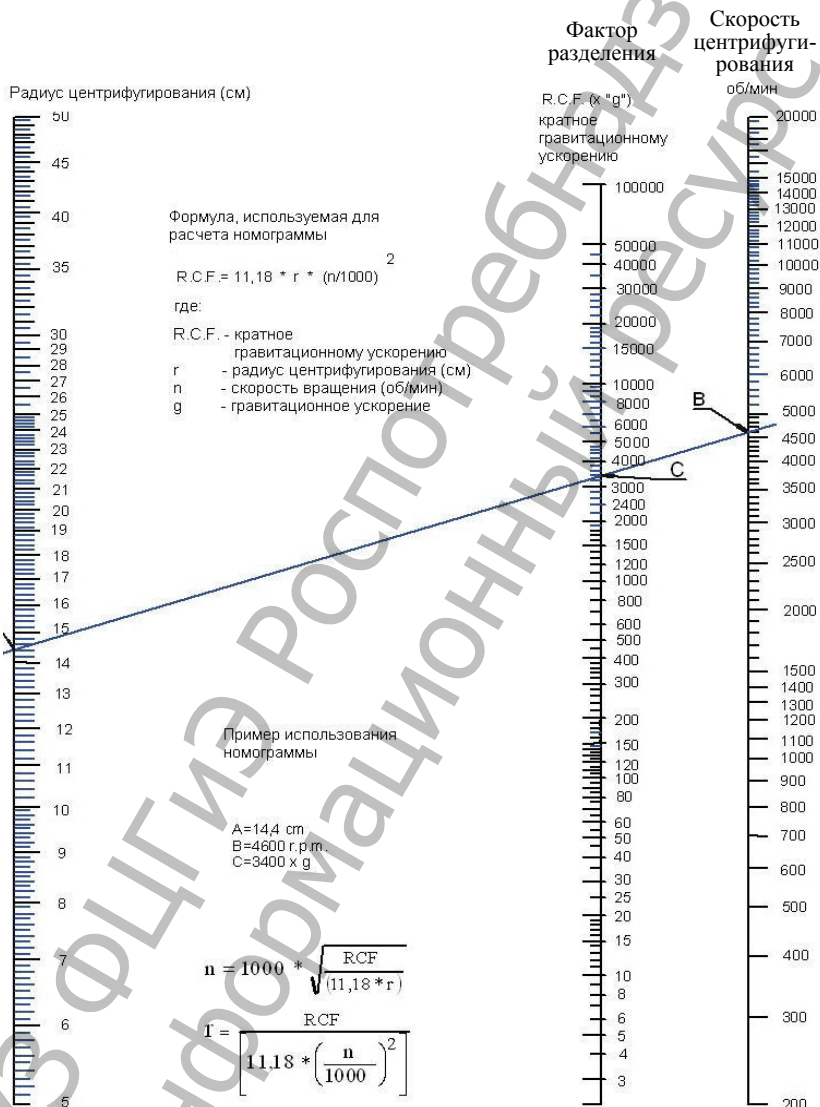
Таким образом, для получения фактора разделения 4000 g необходимо установить скорость центрифугирования примерно 6700 об/мин.

Способ 2 – с использованием номограммы

На номограмме проводят прямую линию от точки 8 на шкале «Радиус центрифугирования» через точку 4000 на шкале «Фактор разделения RFS» до пересечения со шкалой «Скорость центрифугирования», точка пересечения с которой определяет скорость центрифугирования – примерно 6700 об/мин.

Примечание. Необходимо учитывать, что средний радиус определяется как расстояние от оси ротора до точки середины высоты столбика жидкости в центрифужной пробирке и будет меняться в зависимости количества жидкости в центрифужной пробирке (высоты столбика жидкости).

Номограмма для определения скорости центрифугирования при заданном факторе разделения для центрифуг различных моделей



Библиографические ссылки

1. Приказ Минтруда России от 19.04.2017 № 371н «Об утверждении Правил по охране труда при использовании отдельных видов химических веществ и материалов».

2. МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

3. ГОСТ 1770 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия».

4. ГОСТ 29227 (ИСО 835-1) «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования».

5. ГОСТ 6709 «Вода дистиллированная. Технические условия».

6. ГОСТ 12026 «Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия».

7. ГОСТ 23932 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия».

8. ГОСТ 25336 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

9. ГОСТ 12.1.007 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

10. ГОСТ 12.1.019 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

11. ГОСТ 12.1.004 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная безопасность. Общие требования».

12. ГОСТ 12.4.009 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание».

13. ГОСТ 12.0.004 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Организация обучения безопасности труда. Общие положения».

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

**Количественное определение остаточных количеств бацитрацина
в пищевой продукции животного происхождения методом
конкурентного иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3681—20**

Формат 60x88/16

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 13.12.2021

Тираж 100 экз.

Печ. л. 1,5
Заказ 83

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19А (<https://fcgiie.ru>)

Реализация печатных изданий и полиграфической продукции,
тел./факс: 8 (495) 633-18-17; print_zakaz@fcgiie.ru