

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Количественное определение остаточных
количеств аминогликозидов
(стрептомицина и дигидрострептомицина)
в пищевой продукции животного
происхождения методом конкурентного
иммуноферментного анализа**

Методические указания
МУК 4.1.3682—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 аминогликозидов (стрептомицина и
дигидрострептомицина) в пищевой продукции
животного происхождения методом
конкурентного иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3682—20**

ББК 51.23

К60

К60 **Количественное** определение остаточных количеств аминокликозидов (стрептомицина и дигидрострептомицина) в пищевой продукции животного происхождения методом конкурентного иммуоферментного анализа: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022.—26 с.

ISBN 978–5–7508–1967–6

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. Введены впервые.

Свидетельство об аттестации методики (метода) измерений № 0134/РОСС RU.0001.310430/2021 от 05.02.2021 г., номер в реестре аттестованных методик ФР.1.31.2021.40253

ББК 51.23

ISBN 978–5–7508–1967–6

© 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
аминогликозидов (стрептомицина и
дигидрострептомицина) в пищевой продукции
животного происхождения методом конкурентного
иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3682—20**

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) распространяются на продовольственное (пищевое) сырье и пищевую продукцию животного происхождения: молоко (сырое и питьевое, сухое), мясо (говядина, свинина, птица), субпродукты (печень, почки), креветки, мёд.

МУК устанавливают порядок применения методики количественного определения остаточных количеств аминогликозидов (стрептомицина и дигидрострептомицина) 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 ИФА основан на реакции «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты антителами захвата, специфическими к антителам на стрептомицин (вещество стандарта). В лунки дозируют растворы стандартов или проб и конъюгат стрептомицина. Свободный стрептомицин, содержащийся в пробе или стандартных растворах, и стрептомицин, конъюгированный с ферментом, конкурируют за места связывания с антителами к стрептомицину (конкурентный иммуноферментный анализ). Все несвязанные молекулы конъюгата затем удаляются на этапе отмывки. Связанные молекулы конъюгата превращают хромоген в окрашенные в синий цвет продукты реакции. Внесение стоп-раствора изменяет окраску от синей к желтой. Измерения выполняют фотометрически при длине волны 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации стрептомицина в пробе.

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 стрептомицина¹

Анализируемый объект	Диапазон измеряемых концентраций ² , мг/кг (мг/дм ³)	Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm \delta$, % $P = 0,95$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), 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 двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях), R , %, ($P = 0,95$)	Средняя полнота извлечения вещества, %
Молоко	0,005—0,370	35,0	4,7	6,6	13	18	110,2
Молоко сухое	0,047—3,785	25,0	6,3	8,8	18	25	106,6
Мясо свинины, говядины	0,028—2,275	30,0	5,6	7,9	16	22	88,3
Мясо птицы	0,028—2,130	25,0	7,0	9,8	20	27	95,4
Печень	0,028—2,250	25,0	3,0	4,1	8	12	90,3
Почки	0,031—2,500	45,0	3,8	5,3	11	15	80,7
Креветки	0,033—2,660	60,0	7,7	10,8	22	30	75,6
Мёд	0,002—0,185	35,0	5,7	8,0	16	22	87,4

IV. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

4.1. При выполнении измерений и подготовке проб применяют средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы, приведенные в табл. 4.1—4.3.

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

² Указаны пределы определения остаточных количеств стрептомицина – вещества стандарта (специфичность 100 %) при использовании тест-набора «RIDASCREEN Streptomycin».

Средства измерений

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
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
Цилиндры мерные вместимостью 100, 250, 1000 см ³	ГОСТ 1770
Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 50, 100, 200 и 1000 см ³	ГОСТ 1770
Пипетки (с делениями) 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
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	ГОСТ 23932
Колонки для твердофазной экстракции (например, RIDA C18 арт. R2002) или аналогичные	—
Магнитная мешалка	—
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000; 5,000 см ³ однократного применения	—
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 см ³ и 50 см ³	—
Пробирки полипропиленовые по типу «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 см ³	—
Стаканы химические вместимостью 50, 100 см ³	ГОСТ 25336
Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранновакуумным насосом и рабочим диапазоном температур, обеспечивающим работу при 60 °С	
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)	
Устройство для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд) или пластиковый шприц на 20 см ³ с резиновой пробкой (для экстракции проб мёда)	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS) ³ до 4000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	

³ Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в приложении к МУК.

Продолжение табл. 4.2

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 переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости до 100 об./мин	—
Шкаф (стол) лабораторный	—
Шпатели или стеклянные палочки	

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
1-гептансульфоновой кислоты натриевая соль для ВЭЖХ	—
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Натрий фосфорнокислый трехзамещенный 12-водный (тринатрийфосфат) ($\text{Na}_3\text{P}_0_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$), чда	ГОСТ 9337
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
Натрий хлористый (HCl), хч	ГОСТ 4233
Ортофосфорная кислота (H_3P_0_4) 85%-я, чда	ГОСТ 6552

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

4.2. Количественное определение аминогликозидов (стрептомицин, дигидрострептомицин) по технологии ИФА проводят с тест-набором с внутренним стандартом, рассчитанным на проведение анализа 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (в 2 повторностях), в составе (табл. 4.4).

Таблица 4.4

Пример состава тест-набора⁴

Наименование вспомогательного оборудования, устройств, материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсibiliзиро-ванных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.	Инструкция к набору
2. Комплект стандартных растворов стрептомицина со следующими концентрациями: 0; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 мкг/дм ³ в воде по 1,3 см ³ (6 шт.)	Инструкция к набору
3. Конъюгат, готовый к использованию (6 см ³)	Инструкция к набору
4. Смесь субстрата с хромогеном содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин, готовая к использованию (10 см ³)	Инструкция к набору
5. Стоп-реагент, содержащий раствор 1 н серной кислоты (14 см ³)	Инструкция к набору
6. Моющий буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина (PBS-буфер с твином) (1 пакет)	Инструкция к набору

Пример специфичности методики определения аминокликозидов (стрептомицин, дигидрострептомицин), установленной по перекрестной чувствительности к исследованным антибиотикам в буферной системе с тест-набором, представлен в табл. 4.5.

Таблица 4.5

Пример специфичности тест-набора⁵

Вещество	Специфичность, %
Стрептомицин (вещество стандарта)	100
Дигидрострептомицин	69
Гентамицин, неомицин, спектиномицин, канамицин	< 1

V. Требования безопасности

5.1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, уста-

⁴ Тест-набор «RIDASCREEN Streptomycin».

⁵ Тест-набор «RIDASCREEN Streptomycin».

новленных 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 попадания 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 документом⁶.

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

⁶ МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

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 смесью 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 10 мМ моющего буферного раствора с рН 7,4 (PBS-буфер с твином).

Способ 1. Используют пакет с солью для приготовления моющего буфера, входящий в комплект набора. Растворяют содержимое целого пакетика в 1 дм³ дистиллированной воды. Готовый 10 мМ моющий бу-

фер может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 4—6 недель.

Способ 2. Растворяют содержимое пакетика в 100 см³ дистиллированной воды, чтобы получить 10-кратный концентрат моющего буфера. Раствор может храниться при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение 8—12 недель.

Для приготовления готового к употреблению 10 мМ моющего буфера растворяют одну часть 10-кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды. Готовый 10 мМ моющий буфер может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 4—6 недель.

9.4.2. Приготовление буферного раствора PBS для разбавления проб (PBS-буфер).

Навески 0,63 г натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного, 5,7 г натрия фосфорнокислого двухзамещенного 12-водного и 9 г NaCl довести до 1000 см³ дистиллированной водой в мерной колбе, тщательно перемешать до полного растворения.

Готовый буферный раствор PBS хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 6 недель.

9.4.3. Приготовление 3,4%-го (по объему) раствора ортофосфорной кислоты.

В мерную колбу на 100 см³ наливают около 50 см³ дистиллированной воды, вносят 4 см³ ортофосфорной кислоты 85%-й, перемешивают, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают.

Раствор ортофосфорной кислоты хранят в стеклянной таре с плотно закрытой крышкой 2—3 недели.

9.4.4. Приготовление экстракционного буфера (раствор 50 мМ натриевой соли гептансульфоновой кислоты с 25 мМ тринатрийфосфата с рН 2,0).

Готовят в следующей пропорции: навески 2,0 г натриевой соли гептансульфоновой кислоты и 1,9 г тринатрийфосфата 12-водного растворяют в 170—190 см³ дистиллированной воды, устанавливают рН 3,4%-м раствором ортофосфорной кислоты $2,0 \pm 0,1$, доводят дистиллированной водой до конечного объема 200 см³.

Раствор натриевой соли гептансульфоновой кислоты с тринатрийфосфатом готовят в необходимом количестве непосредственно перед анализом с соблюдением указанных соотношений компонентов. Раствор хранению не подлежит.

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.

9.5.1. Молоко (сырое, питьевое).

Пробу молока предварительно обезжиривают, для чего центрифугируют в течение 5 мин при 2000 g и температуре не выше 4 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике в течение 20—30 минут).

Образовавшийся верхний слой жира удаляют с помощью шпателя или стеклянной палочки, обезжиренный супернатант используют для дальнейшего анализа.

Обезжиренную пробу исследуемого продукта разбавляют в соотношении 1 : 10 (1+9) буфером для разбавления проб (п. 9.4.2) (например, 0,05 см³ молока + 0,45 см³ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Для анализа используют 0,05 см³ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10.

9.5.2. Сухое молоко.

Навеску исследуемого сухого продукта массой 1 г суспендируют в 9 см³ дистиллированной воды и перемешивают на вортексе до полного растворения.

Пробу исследуемого продукта центрифугируют в течение 5 мин при 2000 g 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).

Образовавшийся верхний слой жира удаляют с помощью шпателя или стеклянной палочки, обезжиренный супернатант отбирают в пустую пробирку.

Обезжиренный супернатант разбавляют в соотношении 1 : 10 (1 + 9) буфером для разбавления проб (п. 9.4.2) (например, 0,05 см³ мо-

лока + 0,45 см³ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Для анализа используют 0,05 см³ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата (в пересчете на сухой продукт) учитывают фактор разбавления – 100.

9.5.3. Подготовка проб мяса (говядина, свинина, птица) и субпродуктов (печень, почки).

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

Навеску исследуемого продукта массой 5 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, добавляют 20 см³ моющего буфера (п. 9.4.1), допускается внесение пробы по 2,5 г в 2 пробирки вместимостью 15 см³ с последующим объединением полученных обезжиренных фугатов. Перемешивают на вортексе в течение в течение 10 с, затем перемешивают встряхиванием в течение 30 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Центрифугируют 10 мин при 4000 g при 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).

Из пробирок удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки, из обезжиренной надосадочной фазы переносят 1 см³ пробы в пустую пробирку (или по 0,5 см³ из двух пробирок). Полученный экстракт разбавляют моющим PBS-буфером с твином (п. 9.4.1) в соотношении 1 : 10 (1 + 9) (например, 0,05 см³ надосадочной фазы + 0,45 см³ моющего буфера).

Для анализа используют 0,05 см³ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 50.

9.5.4. Подготовка проб креветок.

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

Навеску исследуемого продукта массой 5 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 см³, добавляют 20 см³ моющего буфера (п. 9.4.1), допускается внесение пробы по 2,5 г в 2 пробирки вместимостью 15 см³ с последующим объединением полученных обезжиренных фугатов. Перемешивают на вортексе в течение 10 с, затем перемешивают встряхиванием в течение 30 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Центрифугируют 10 мин при 4000 g при 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).

Из пробирок удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки, из обезжиренной надосадочной фазы переносят 1 см³ пробы в пустую пробирку (или по 0,5 см³ из двух пробирок). Полученный экстракт разбавляют моющим PBS-буфером (п. 9.4.1) в соотношении 1 : 10 (1 + 9) (например, 0,05 см³ нижней фазы + 0,45 см³ моющего буфера).

Для анализа используют 0,05 см³ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 50.

9.5.5. Подготовка проб мёда.

Навеску мёда массой 1 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см³, добавляют 9 см³ экстракционного буфера (п. 9.4.4). Встряхивают до полного растворения меда.

Центрифугируют 10 мин при 3000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С), полученный прозрачный супернатант отбирают в пустую пробирку. Далее проводят очистку методом твердофазной экстракции с колонками С18. В зависимости от вида используемых колонок процедура их кондиционирования будет отличаться.

Очистка раствора мёда методом твердофазной экстракции.

При использовании колонок С18 процедуру предварительного кондиционирования колонки проводят путем последовательного промывания метанолом, водно-метанольными смесями и водой со скоростью потока 1 кап./с по следующей схеме:

- 1) промывают колонку 2 см³ метанола (100 %);
- 2) промывают колонку 0,5 см³ смеси метанол/дистиллированная вода (75/25, об./об.);
- 3) промывают колонку 0,5 см³ смеси метанол/дистиллированная вода (50/50, об./об.);
- 4) промывают колонку 0,5 см³ смеси метанол/дистиллированная вода (25/75, об./об.);
- 5) промывают колонку 2 см³ дистиллированной воды.

Водные растворы метанола различной концентрации для кондиционирования колонок С18 должны быть приготовлены за 1 ч до ис-

пользования⁷. Для удаления воздушных пузырьков непосредственно перед использованием растворы перемешивают на вортексе.

При работе с колонкой используют устройство для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд), руководствуясь инструкцией по его эксплуатации.

Примечание. При отсутствии устройства для твердофазной экстракции для создания давления воздуха на входе в колонку допускается использование пластикового шприца на 20 см³ с резиновой пробкой, соединенного с колонкой через стеклянный буферный цилиндр и пластиковый переходник.

После кондиционирования на подготовленную колонку наносят 5 см³ супернатанта и медленно продавливают через колонку со скоростью примерно 15 кап./мин.

После этого колонку промывают 3 см³ дистиллированной воды со скоростью потока 1 кап./с, удаляют остатки жидкости, продувая колонку потоком воздуха или азота в течение 2 мин.

Адсорбированные на колонке вещества осторожно элюируют 1 см³ 100%-го метанола в чистую пробирку. Элюирование пробы проводят медленно – со скоростью примерно 15 кап./мин.

Полученный элюат испаряют досуха при 60 °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Сухой остаток растворяют в 2 см³ PBS-буфера для проб (п. 9.4.2) и тщательно перемешивают на вортексе. Для анализа используют 0,05 см³ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 4.

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.

⁷ При использовании колонок RIDA C18 процедуру их кондиционирования проводят следующим образом: колонку промывают со скоростью потока 1 кап./с сначала пропуская 2 см³ 100%-го метанола, а затем 2 см³ дистиллированной воды, используя устройства для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд) и руководствуясь инструкцией по его эксплуатации. После кондиционирования на подготовленную колонку наносят 5 см³ супернатанта исследуемого образца, как описано далее.

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-системы 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 2—8 °С.

10.2.2. Перед использованием тест-системы 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-системы 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. Алгоритм проведения исследования

10.3.1. 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.

10.3.2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 см³ каждой концентрации раствора стандарта, раствора подготовленной пробы продукта.

10.3.3. Затем в каждую лунку добавляют по $0,05 \text{ см}^3$ конъюгата. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение 30 мин в темном месте.

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

10.3.5. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер с твином по п. 9.4.1), внося по $0,25 \text{ см}^3$ в каждую лунку, используя восьмиканальный дозатор. После контакта выливают буфер для промывки из лунок и тщательно выбивают капельки жидкости. Процедура отмывки повторяется трижды.

Допускается для увеличения производительности использование автоматического устройства для отмывки иммунологических планшетов (при наличии).

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

10.3.6. 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 °С) в течение 15 мин в темном месте.

10.3.7. 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 15 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 мкг/дм³;

C_i – концентрация антибиотика в i -м градуировочном растворе, мкг/дм³ (нг/см³).

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 пяти градуировочных растворов, где ($i = 2 \dots 6$), C_i – 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/дм³) (нг/г или нг/см³);

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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности пяти стандартных растворов антибиотика ($i = 2 \dots 6$) (или исследуемых экстрактов испытуемых проб);

B_0 – 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 (нг/см^3) в экстракте испытуемой пробы считают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности (в пределах значений 2–6 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 аминогликозидов
в различных пробах**

Образец	Фактор разбавления
Молоко (сырое и питьевое)	10
Молоко сухое (в пересчете на сухой продукт)	100
Мясо (свинина, говядина, птица) и субпродукты (печень, почки)	50
Креветки	50
Мёд	4

XII. 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 табл. 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, 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.

XIII. Оформление результатов

13.1. Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 аминокликозидов (стрептомицин и дигидрострептомицин)* в молоке $< 0,005 \text{ мг/дм}^3$ ».

Примечание. *При отсутствии информации от производителя сырья животного происхождения о применении конкретного вида антибиотика результат определения распространяется на сумму аминокликозидов (стрептомицин и дигидрострептомицин), что определяется специфичностью тест-набора: 100% – стрептомицин и 69% – дигидрострептомицин (табл. 4.5).

XIV. 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), выраженного 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 вращающегося 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):

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

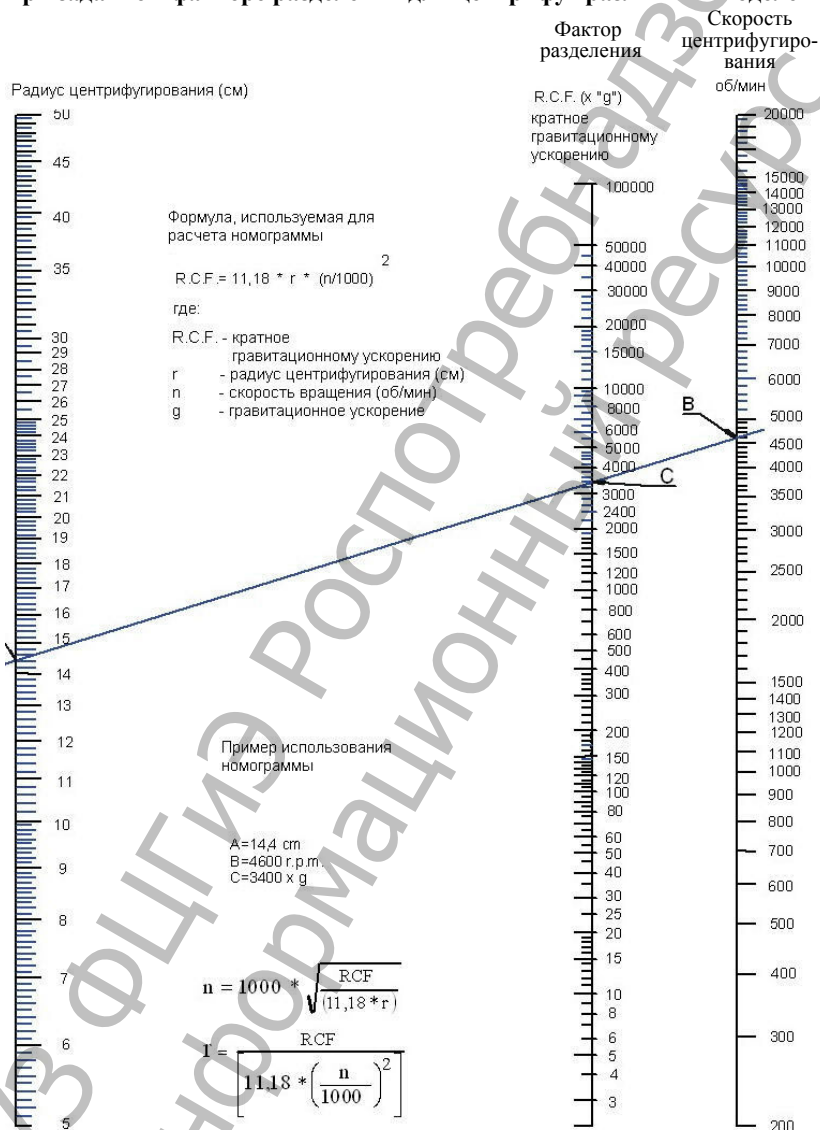
Таким образом, для получения фактора разделения 4000 g необходимо установить скорость центрифугирования примерно 6700 об/мин.

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 6995 «Реактивы. Метанол-яд. Технические условия».

7. ГОСТ 9337 «Натрий фосфорнокислый 12-водный. Технические условия»

8. ГОСТ 4172 «Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия».

9. ГОСТ 245 «Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия».

10. ГОСТ 4233 «Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия».

11. ГОСТ 6552 «Кислота ортофосфорная. Технические условия».

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

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

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

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

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

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

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

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

**Количественное определение остаточных количеств
аминогликозидов (стрептомицина и дигидрострептомицина)
в пищевой продукции животного происхождения методом
конкурентного иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3682—20**

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 13.128.2021

Формат 60x88/16

Тираж 100 экз.

Печ. л. 1,75
Заказ 84

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://fcgie.ru>)

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