ISBN 978-5-7508-1964-5



Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Количественное определение остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

Методические указания
МУК 4.1.3679—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 хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

Методические указания
МУК 4.1.3679—20

Информационный ресурс ФБУЗ ЦГиЭ Роспотребнадзора

ББК 51.23
К60

К60 **Количественное** определение остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) 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.—31 с.

ISBN 978–5–7508–1964–5

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. Малинкин, 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 4.1.3679—20 введены взамен пункта 5 МУК 4.1.1912—04 «Определение остаточных количеств левомицетина (Хлорамфеникола, Хлормицетина) в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноферментного анализа», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 01.05.2004 и главы I.1.А 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 № 0267/РОСС RU.0001.310430/2022 от 07.02.2022 г., номер в реестре аттестованных методик ФР.1.31.2022.42676

ББК 51.23

ISBN 978–5–7508–1964–5

© Роспотребнадзор, 2022

Информационный ресурс ФБУН ФИЦ Роспотребнадзора

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 хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

Методические указания
МУК 4.1.3679—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, сгущенное), сливки, молочные смеси для детей (сухие), йогурт, кефир, сметану, сыворотку сухую и напитки на основе сыворотки, творог и творожные продукты (творог зернённый, творожная масса), сыры (молодой и зрелый), масло из коровьего молока, спред, мясо (говядина, свинина, курица, индейка), мясные субпродукты (печень, почки, жир), рыбу (лососевые) и креветки.

МУК устанавливают порядок применения методики количественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) 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 продо-

Информационный портал ФБУЗ ЦГиЭ Роспотребнадзора

вольственного 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 хлорамфениколу (вещество стандарта), которые связаны иммобилизированными антителами захвата. В лунки вносят растворы стандартов или проб и конъюгат хлорамфеникола. Свободный хлорамфеникол, содержащийся в пробе или стандартных растворах, и хлорамфеникол, конъюгированный с ферментом, конкурируют за места связывания с антителами (конкурентный иммуноферментный анализ). Все несвязанные молекулы конъюгата затем удаляют на этапе отмывки. Конъюгат преобразует 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 хлорамфеникола 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.

Информационный портал ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

Таблица 3.1

Значения характеристики погрешности, нормативов оперативного контроля точности, повторяемости, воспроизводимости, полнота извлечения при количественном определении хлорамфеникола[1]

Анализируемый объект	Диапазон измеряемых концентраций, мг/кг ($мг/дм^3$)	Показатель точности (границы относительной погрешности), ±δ, % $P = 0,95$	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, %
1	2	3	4	5	6	7	8
Молоко	0,00003—0,00080	42	2,7	3,7	7	10	93
Молочная смесь для детского питания (восстановленная, жидкая)	0,00003—0,00078	37	2,5	3,6	7	10	96
Йогурт	0,00001—0,00036	39	3,6	5	10	14	104
Йогурт с фруктовыми наполнителями	0,00001—0,00036	36	4,0	5,5	14	16	104
Кефир	0,00001—0,00036	40	3,2	4,5	9	12	104
Пахта и сыворотка	0,00001—0,00036	37	4,0	5,6	11	16	104
Сливки	0,00001—0,00036	37	3,8	5,4	11	15	104
Творог	0,00003—0,00082	45	6,0	8,4	17	24	92

[1] Пример метрологических характеристик при использовании тест-набора «RIDASCREEN Chloramphenicol».

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

Продолжение табл. 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8
Сметана	0,00003—0,00082	42	5,3	7,5	15	21	92
Масло из коровьего молока (сливочное)	0,00016—0,00476	55	4,1	5,8	12	16	82
Сыр	0,00003—0,00101	53	4,1	5,7	11	16	74
Мясо скота и птицы	0,00007—0,00206	42	5,1	7,2	14	20	91
Рыба	0,00007—0,00202	36	4,1	5,7	11	16	97
Креветки	0,00007—0,00204	41	4,0	5,6	11	16	92
Яйца (сырые, замороженные)	0,00003—0,00090	51	3,6	5	10	14	98
Мёд	0,000025—0,00071	38	4,4	6,1	12	17	106

Примечание. При введении (при необходимости) дополнительного разведения подготовленного экстракта (например, в 33 раза) максимальная граница диапазона определяемого содержания хлорамфеникола (левомицетина) может быть увеличена с учетом фактора разведения и полноты извлечения для каждого вида анализируемого образца (например, при дополнительном разведении в 33 раза диапазон определяемого содержания будет включать значение 0,01 мг/кг).

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.

Таблица 4.1

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 ±(5,0÷2) %с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утверждённые типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений

Информационный ресурс ФБУН ЦНИИ Роспотребнадзора

Продолжение табл. 4.1

1	2
Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с переменными объемами от 0,02 до 0,2 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования не более ±(2,0÷1,5) %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утверждённые 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 ±(1,5÷1,0) %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утверждённые 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 «Утверждённые 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 ±(2,0÷1,5) %, с одноразовыми наконечниками	Внесено в реестр «Утверждённые 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 «Утверждённые 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 «Утверждённые 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 ±0,01 (не более)фл	Внесено в реестр «Утверждённые типы средств измерений» Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений
Цилиндры мерные 100, 250, 1000 $см^3$	ГОСТ 1770
Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 50, 100, 250, 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 средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

Информационный ресурс ФБУЗ «ЦГиЭ» Роспотребнадзора

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 ± 1) °С	–
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 $см^3$	–
Пробирки стеклянные вместимостью не менее 15 $см^3$ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 25336
Пробирки стеклянные центрифужные вместимостью до 10 $см^3$	ГОСТ 1770 (ИСО 1042, ИСО 4788)
Стаканы химические вместимостью 25, 50, 100 $см^3$	ГОСТ 25336
Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранновакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С	–
Устройство для отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микрокювету, от 0,1 $см^3$ до 0,350 $см^3$ (при наличии)	–
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[2] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	

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

Информационный ресурс ФБУН ФНЦГиЭ Роспотребнадзора

Продолжение табл. 4.2

1	2
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS) до 20 000 g	–
Шейкер для пробирок вортексного 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
Калий железистосинеродистый 3-водный (желтая кровяная соль), чда	ГОСТ 4207
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($Na_2HP0_4 \times 12H_20$), хч	ГОСТ 4172
Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($NaH_2P0_4 \times 2H_20$), хч	ГОСТ 245
Натрий хлористый (HCl), хч	ГОСТ 4233
Натрия гидроокись (NaOH), хч	ГОСТ 4328
Цинк сернокислый 7-водный ($ZnS0_4 \times 7H_20$), хч	ГОСТ 4174
Этилацетат, сорт высший	ГОСТ 8981
н-Гексан	Содержание основного компонента не менее – 99,85 %

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

4.2. Количественное определение хлорамфеникола 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).

Информационный сервер ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

Таблица 4.4

Пример состава тест-набора[3]

Наименование компонентов набора	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем	Инструкция к набору
2. Комплект стандартных растворов хлорамфеникола со следующими концентрациями: 0, 25, 50, 100, 250, 750 нг/дм^3 в воде по 1,3 см^3 (6 шт.)	Инструкция к набору
3. Конъюгат хлорамфеникола с пероксидазой, готовый к употреблению (7,5 см^3)	Инструкция к набору
4. Готовая смесь субстрата с хромогеном, содержащая пероксидкарбамида и тетраметилбензидин (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 (1 пакет)	Инструкция к набору

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

Таблица 4.5

Пример специфичности тест-набора[4]

Вещество	Специфичность, %
Хлорамфеникол (PR-пара-стереоизомер) (вещество калибровочного стандарта)	100 %
Декстрамицин (SS-пара-стереоизомер)	< 1%
Все другие стереоизомеры	Не определялось
Хлорамфеникол, основание	< 1%
Флорфеникол	< 1%
Тиамфеникол	< 1%
Нитрофурантоин, AHD, NP-AHD	< 1%
Фуралтадон, AMOZ, NP-AMOZ	< 1%
Фуразолидон, AOZ, NP-AOZ	< 1%
Нитрофуразон, SEM, NP-SEM	< 1%
Хлорамфеникол глюкоронид	Прим. 68%

[3] Тест-набор «RIDASCREEN Chloramphenicol».
[4] Тест-набор «RIDASCREEN Chloramphenicol».

Информационно-ресурсный отдел ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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 с 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.

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

VII. Отбор проб

7.1. Отбор проб осуществляют в соответствии с методическим документом[5].

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 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, pH-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.

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

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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 pH 7,4 (PBS-буфер с твином).

Для приготовления буферного раствора используют входящий в комплект набора пакет с сухой солью для PBS-буфера.

Способ 1. Растворяют содержимое целого пакетика в 1 $дм^3$ дистиллированной воды. Готовый 10 мМ моющий буфер может храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С в течение 4—6 недель.

Способ 2. Растворяют содержимое пакетика в 100 $см^3$ дистиллированной воды, чтобы получить 10-кратный концентрат моющего буфера. Раствор может храниться около 8—12 недель при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С).

Для приготовления готового к употреблению 10 мМ моющего буфера растворите 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 20 мМ буферного раствора (PBS-буфер).

Навески натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного 1,10 г, натрия фосфорнокислого двузамещённого 12-водного 3,22 г и натрия хлористого 8,77 г растворяют в объеме 800—900 $см^3$ дистиллированной воды, доводят pH до 7,4 0,5 н раствором гидроокиси натрия, далее доводят объем раствора дистиллированной водой в мерной колбе до метки 1 000 $см^3$, тщательно перемешивают.

Готовый 20 мМ буферный раствор (PBS-буфер) хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С не более 6 недель.

9.4.3. Приготовление осадителей (растворы Карреза).

Осадитель 1 (раствор Карреза I): навеску 15,21 г калия железисто-синеродистого 3-водного разводят в мерной колбе объемом 100 $см^3$ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Раствор железосинеродистого калия (осадитель I) хранят в склянке из темного стекла не более 10 сут.

Осадитель 2 (раствор Карреза II): навеску 29,90 г сульфата цинка 7-водного разводят в мерной колбе объемом 100 $см^3$ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Раствор сульфата цинка (осадитель II) хранят в стеклянной посуде не более 10 сут.

9.4.4. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия.

Информационный портал ФБУН ЦНИЭ Роспотребнадзора

Навеску 5 г гидроокиси натрия разводят в мерной колбе объемом 250 см^3 дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

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

9.4.5. Приготовление 10%-го раствора метанола.

Для получения 10%-го раствора метанола отбирают 10 см^3 метанола в мерную колбу объемом 100 см^3 и разводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

9.4.6. Приготовление 20%-го растворов метанола.

Для получения 20%-го раствора метанола отбирают 20 см^3 метанола в мерную колбу объемом 100 см^3 и разводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

Растворы метанола готовят в необходимом количестве непосредственно перед анализом с соблюдением указанных соотношений компонентов, остатки утилизируют в соответствии с установленными правилами.

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. Подготовка проб молока (сырое, питьевое, сухое), молочных смесей для детского питания (сухие, жидкие).

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 см^3 дистиллированной воды. Пробы при необходимости нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. 9.4.4), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

Способ А (прямое внесение). Жидкий или восстановленный продукт центрифугируют в течение 5 мин при 2 000 g и температуре не выше 4 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается прово-

Информационный портал ФБУН ФНЦГ им. Роспотребнадзора

дить 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 и используют для дальнейшего анализа.

Непосредственно перед анализом подготовленную пробу перемешивают с помощью вортекса. Далее вносят по 0,05 $см^3$ пробы в лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

Способ Б (экстракция из сухого образца). Экстракцию хлорамфеникола непосредственно из сухого молочного продукта, сухой молочной смеси, в том числе смеси для питания детей, проводят следующим образом.

Растворяют 2 г сухого молока в 10 $см^3$ дистиллированной воды в центрифужной пробирке вместимостью 15 $см^3$. Добавляют 0,5 $см^3$ осадителя 1 (раствор Карреза I) (п. 9.4.3) и тщательно перемешивают на вортексе. Затем добавляют 0,5 $см^3$ осадителя 2 (раствор Карреза II) (п. 9.4.3) и снова интенсивно перемешивают на вортексе. Далее смесь центрифугируют 10 мин при 3 000 g при температуре от плюс 2 до плюс 12 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением предварительно охладить пробы до (8 ± 1) °С в холодильнике).

Супернатант 3,6 $см^3$ (соответствует 0,6 г сухого молока/смеси) переносят в чистую центрифужную пробирку на 15 $см^3$, добавляют 6 $см^3$ этилацетата и экстрагируют встряхиванием в течение 10 мин. Затем смесь центрифугируют при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение 10 минут при 3000 g.

Этилацетатный супернатант 4 $см^3$ переносят в новую чистую стеклянную пробирку и испаряют экстракт досуха при 60 °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Если после сушки пробы на дне пробирки обнаруживается жирный остаток, то проводят процедуру обезжиривания так, как описано в примечании к настоящему разделу. После чего сухой остаток растворяют так, как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,4 $см^3$ 10 мМ моющего буфера (п. 9.4.1) и тщательно перемешивают на вортексе.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата (в сухом продукте) учитывают фактор разбавления – 1.

Информационный портал ФБУЗ ЦНИИ Роспотребнадзора

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 см^3 экстракта + 3,2 см^3 моющего буфера).

Примечание. Для обезжиривания сухого остатка к сухому остатку приливают 0,4 см^3 н-гексана и перемешивают на вортексе, далее приливают 0,4 см^3 моющего буфера и повторно перемешивают на вортексе. Смесь центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). Нижнюю водную фазу отбирают в чистую пробирку и далее используют в соответствии с последующей процедурой. При этом фактор разведения пробы не меняется.

При проведении пробоподготовки с использованием этилацетата и гексана для исключения ложноположительных результатов необходимо использовать отрицательный контроль. В качестве отрицательного контроля вместо пробы вносят соответствующий объем дистиллированной воды и проводят все процедуры экстракции так же, как с исследуемым образцом, с последующим внесением в лунку планшета. При расчете конечного результата полученные значения вычитают из значений исследованного образца (для расчета используют тот же фактор разбавления).

9.5.2. Йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, пахта и сыворотка, сливки.

Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. 9.4.4), доводя значение pH до 7,0 ± 0,5. При исследовании продукта с фруктами отбрасывают частицы твердой консистенции, отбирают жидкую фракцию. Экстракцию хлорамфеникола из исследуемого образца проводят следующим образом.

Навеску 10,0 г пробы вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3 с завинчивающейся крышкой, приливают 8,0 см^3 20 мМ буфера (п. 9.4.2) и перемешивают. Далее добавляют 1 см^3 осадителя 1 (раствор Карреза I) (п. 9.4.3) и тщательно перемешивают на вортексе. После чего вносят 1 см^3 осадителя 2 (раствор Карреза II) (п. 9.4.3) и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Готовую смесь перед центрифугированием, при необходимости, допускается переносить в центрифужные пробирки объёмом 15 см^3, далее центрифугируют 10 мин при 4 000 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).

Информационный сборник ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

Супернатант 4 см^3 переносят в новую пробирку, приливают 8 см^3 этилацетата и встряхивают, перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом). После чего центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С).

Супернатант 4 см^3 переносят в новую стеклянную пробирку и испаряют при 60 °С досуха в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Если после сушки пробы на дне пробирки обнаруживается жирный остаток, то проводят процедуру обезжиривания, как описано в примечании к п. 9.5.1. После чего сухой остаток растворяют так, как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,5 см^3 10 мМ моющего буфера (п. 9.4.1).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 0,5.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 см^3 экстракта + 3,2 см^3 моющего буфера).

9.5.3. Творог, сметана.

Навеску 5,0 г пробы вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3, прибавляют 15 см^3 10%-го раствора метанола (п. 9.4.5) и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин. Допускается распределение пробы в двух центрифужных пробирках объёмом 15 см^3 при сохранении пропорций количества пробы и объема раствора метанола и с последующим объединением экстрактов. Далее смесь центрифугируют 15 мин при 4 000 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 средней части переносят 4 см^3 пробы в новую пробирку (если проба была распределена на 2 пробирки, то далее используют объединенную пробу по 2 см^3 из каждой пробирки).

К супернатанту прибавляют 8 см^3 этилацетата, перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикаль-

Информационный портал ФБУЗ ЦГиЭ Роспотребнадзора

ным вращением (переворотом). После чего центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—25 °С).

Супернатант 4 см^3 переносят в новую чистую стеклянную пробирку и испаряют при 60 °С досуха в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Если после сушки пробы на дне пробирки обнаруживается жирный остаток, то проводят процедуру обезжиривания, как описано в примечании к п. 9.5.1. После чего сухой остаток растворяют так, как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,5 см^3 10 мМ моющего буфера (п. 9.4.1).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 см^3 экстракта + 3,2 см^3 моющего буфера).

9.5.4. Масло сливочное.

Навеску 2,0 г масла вносят в центрифужную пробирку объёмом 15 см^3, расплавляют масло на водяной бане при температуре примерно (40 ± 1) °С. Прибавляют 2 см^3 н-гексана и перемешивают интенсивно на вортексе в течение 10—15 с. После этого прибавляют 1 см^3 20%-го раствора метанола (п. 9.4.6) и повторно интенсивно перемешивают на вортексе в течение 10—15 с, затем перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом). Центрифугируют 10 мин при 2 000 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).

Нижнюю водную фазу 0,7 см^3 переносят в пробирку по типу «Эппендорф» на 1,5—2 см^3 и помещают на лед на 10 мин. После чего центрифугируют 5 мин при 20 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С). Отбирают нижнюю водную фазу в пустую пробирку.

Нижнюю водную фазу разбавляют 10 мМ моющим буфером (п. 9.4.1) в соотношении 1 : 4,5 (например, 0,2 см^3 нижней фазы + 0,7 см^3 моющего буфера).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 5,2.

Информационный комплекс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 $см^3$ экстракта + 3,2 $см^3$ моющего буфера).

9.5.5. Сыр.

С поверхности образца сыра удаляют плесневый налет (при наличии). Полностью гомогенизируют всё количество представительной пробы в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Навеску сыра 10 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$ и добавляют 30 $см^3$ 10%-го раствора метанола, тщательно перемешивают и инкубируют на водяной бане при (40 ± 1) °С в течение 10 мин, встряхивая интенсивно минимум 3 раза во время инкубации.

После чего центрифугируют 15 мин при 4 000 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).

Нижнюю водную фазу 3,5 $см^3$ переносят в новую центрифужную пробирку, приливают 7 $см^3$ этилацетата и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом). После чего центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С).

Супернатант 3,5 $см^3$ переносят в новую чистую стеклянную пробирку и испаряют экстракт досуха при 60 °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Если после сушки пробы на дне пробирки обнаруживается жирный остаток, то проводят процедуру обезжиривания, как описано в примечании к п. 9.5.1. После чего сухой остаток растворяют так, как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,5 $см^3$ 10 мМ моющего буфера (п. 9.4.1).

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 $см^3$ экстракта + 3,2 $см^3$ моющего буфера).

9.5.6. Подготовка проб мяса (скота и птицы), рыбы (сырая, охлажденная, мороженая, варено-мороженая), креветок.

Информационный портал ФБУН ЦНИЭ Роспотребнадзора

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

Навеску гомогенизированной пробы 3 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, прибавляют 3 $см^3$ дистиллированной воды, 6 $см^3$ этилацетата и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

После чего центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—25 °С).

Супернатант 4 $см^3$ переносят в новую чистую стеклянную пробирку и испаряют экстракт досуха при 60 °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ н-гексана, прибавляют 0,5 $см^3$ 10 мМ моющего буфера (п. 9.4.1) и тщательно перемешивают на вортексе.

Центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). Нижнюю водную фазу отбирают в чистую пробирку.

Нижнюю водную фазу разбавляют 10 мМ моющим буфером (п. 9.4.1) в соотношении 1 : 10 (например, 0,05 $см^3$ нижней фазы + 0,45 $см^3$ моющего буфера).

Для анализа вносят по 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 2,5.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 $см^3$ экстракта + 3,2 $см^3$ моющего буфера).

9.5.7. Подготовка проб яиц (сырые, замороженные).

Экстракцию хлорамфеникола из исследуемого образца проводят следующим образом. Полностью гомогенизируют всё количество представительной пробы в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Навеску 2 г гомогенизированной пробы вносят в центрифужную пробирку объёмом 15 $см^3$, добавляют 8 $см^3$ этилацетата и интенсивно встряхивают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом), после чего центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С).

Супернатант 4 $см^3$ (соответствует 1 г пробы) переносят в новую чистую стеклянную пробирку и испаряют экстракт досуха при 60 °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ н-гексана, прибавляют 1 $см^3$ 10 мМ моющего буфера (п. 9.4.1) и тщательно перемешивают на вортек-

Информационный портал ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

се 1 мин. Центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С). Нижнюю водную фазу отбирают в чистую пробирку.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ нижней водной фазы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 $см^3$ экстракта+ 3,2 $см^3$ моющего буфера).

9.5.8. Подготовка проб мёда.

Экстракцию хлорамфеникола из исследуемого образца проводят следующим образом.

Навеску 2 г мёда вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, прибавляют 4 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают встряхиванием до полного растворения мёда, затем добавляют 4 $см^3$ этилацетата и экстрагируют встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом), после чего центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С).

Супернатант 1 $см^3$ переносят в новую чистую стеклянную пробирку и испаряют досуха при 60 °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Сухой остаток растворяют в 0,5 $см^3$ 10 мМ моющего буфера (п. 9.4.1) и тщательно перемешивают на вортексе.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ нижней водной фазы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

При необходимости для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 33 раза (например, 0,1 $см^3$ экстракта + 3,2 $см^3$ моющего буфера).

X. 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

Информационный портал ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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 полоску). 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. 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.

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

10.3.2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 см^3 каждой концентрации раствора стандарта, раствора подготовленной пробы продукта.

10.3.3. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 см^3 конъюгата. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение 0,5 часа 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), приготовленным по п. 9.4.1, внося по 0,25 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.

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

10.4. После отмывания добавляют по 0,1 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 минут в темном месте.

10.5. По окончании инкубации добавляют в каждую лунку по 0,1 см^3 стоп-реагента. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой.

10.6. Далее измеряют оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм с помощью микропланшетного иммуноферментного анализатора. Время от внесения стоп-реагента до измерения не должно превышать 30 минут.

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 %.

Информационный портал ФБУЗ ЦНИИ Роспотребнадзора

Величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,6 ($A_{450нм} < 0,6$) 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:

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

Bi – оптическая плотность раствора антибиотика;

Bo – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией антибиотика 0,00 мкг/дм^3;

C_i – концентрация антибиотика в *i*-ом градуировочном растворе, нг/дм^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии *a* и *b* проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений Bi/B_0, lnC_i, полученных для пяти градуировочных растворов, где (i = 2...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:

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

X – концентрация антибиотика в пробе, нг/кг (нг/дм^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 $r^2 > 0,98$.

Информационный банк ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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:

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

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...6) (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 хлорамфеникола в нг/дм^3, строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

11.5. Концентрацию хлорамфеникола (x) в нг/дм^3 в экстракте испытуемой пробы считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности (в пределах значений 2—6 градуировочных растворов), которые вычислены по формуле (3).

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

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы (табл. 3);

K – коэффициент пересчета нг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1000 000.

Информационный центр ФБУЗ «ЦГиЭ Роспотребнадзора»

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 пенициллинов в различных пробах

Образец	Фактор разбавления
Молоко (сырое, питьевое), молочные смеси детского питания (жидкие, восстановленные) (*Способ А* – прямое внесение)	1
Молоко (сухое), молочные смеси для детского питания (сухие) (*Способ Б* – экстракция из сухого продукта), в пересчете на сухой продукт	1
Йогурт (с наполнителями и без), кефир, пахта, сыворотка, сливки	0,5
Творог, сметана	1
Сливочное масло	5,2
Сыр	1
Мясо (скота и птицы)	2,5
Рыба и продукция аквакультуры (рыба, креветки) (сырая, охлажденная, мороженая, варено-мороженая)	2,5
Яйца (сырые, замороженные)	1
Мёд	1

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:

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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

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

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

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

XIII. Оформление результатов

13.1. Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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 хлорамфеникола в молоке < 0,00003 мг/кг».

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.

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

Приложение

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) 4000g, если средний радиус вращения столбика жидкости в центрифужной пробирке равен 8 см.

Способ 1 – путем расчета по формуле (2):

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

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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

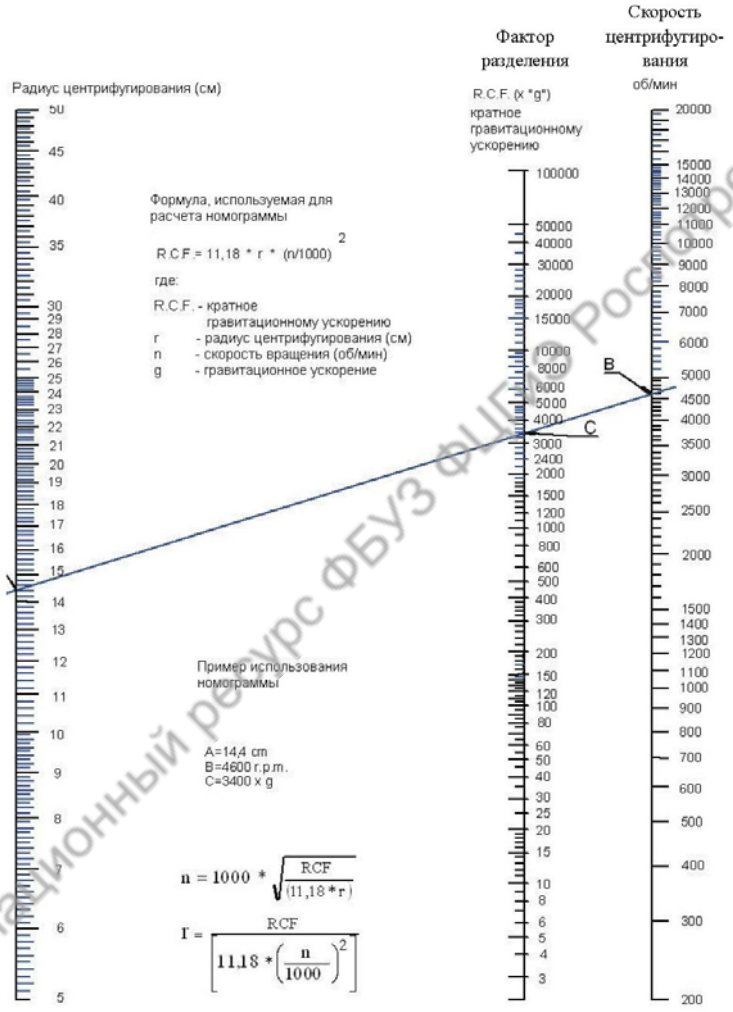
Способ 2 – с использованием номограммы

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 от количества жидкости в центрифужной пробирке (высоты столбика жидкости).

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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



Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

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 4207 «Реактивы. Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия».

7. ГОСТ 6995 «Реактивы. Метанол-яд. 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 4328 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия».

12. ГОСТ 4174 «Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия».

13. ГОСТ 8981 «Эфиры этиловый и нормальный бутиловый уксусной кислоты технические. Технические условия».

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Информационный ресурс ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора

Количественное определение остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

Методические указания
МУК 4.1.3679—20

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 13.12.2021

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,0

Тираж 100 экз. Заказ 81

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

Информационный ресурс ФБУН ФЦГиЭ Роспотребнадзора