

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Количественное определение остаточных
количеств антибиотиков тетрациклиновой
группы в пищевой продукции животного
происхождения методом конкурентного
иммуноферментного анализа**

Методические указания
МУК 4.1.3680—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 антибиотиков тетрациклиновой
группы в пищевой продукции животного
происхождения методом конкурентного
иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3680—20**

ББК 51.23

К60

К60 **Количественное** определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы 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.—30 с.

ISBN 978–5–7508–1965–2

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 4.1.3680—20 введены взамен части 4 МУК 4.1.2158—07 «Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы и сульфаниламидных препаратов в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.01.2007 и главы П.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 № 0265/РОСС RU.0001.310430/2022 от 07.02.2022 г., номер в реестре аттестованных методик ФР.1.31.2022.42673

ББК 51.23

ISBN 978–5–7508–1965–2

© 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
антибиотиков тетрациклиновой группы
в пищевой продукции животного происхождения
методом конкурентного иммуноферментного анализа**

**Методические указания
МУК 4.1.3680—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), сливки, молочные смеси для детей (сухие, восстановленные, жидкие), йогурт, кефир, сметану, творог, сыр, масло из коровьего молока (сливочное), мясо (все виды), колбасные изделия, мясные консервы для детского питания, рыбу креветки, яйца, мёд.

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

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

проведение исследований продовольственного (пищевого) сырья, пищевых продуктов.

1.3. МУК носят рекомендательный характер.

II. Метод измерений

2.1. Метод иммуноферментного анализа основан на реакции «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты конъюгатом тетрациклина с белком. В лунки вносят стандартные растворы тетрациклина или растворы проб, после чего добавляют антитела к тетрациклину. Свободный тетрациклин и иммобилизованный на поверхности тетрациклин конкурируют за места связывания антител (конкурентный иммуноферментный анализ). Все несвязанные антитела удаляются на этапе отмывки, затем добавляются вторичные меченые ферментом антитела, специфичные к антителам против тетрациклина. После удаления несвязанных меченых ферментом антител на этапе отмывки вносят в лунки субстрат/хромоген и инкубируют. Связанные молекулы конъюгата превращают хромоген в окрашенные в синий продукты реакции. Внесение стоп-раствора изменяет окраску от синей к желтой. Измерения выполняют фотометрически при длине волны 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации тетрациклина 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 антибиотиков тетрациклиновой группы¹

Анализируемый объект	Диапазон измеряемых концентраций, 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, полученных в разных лабораториях), R , %, ($P = 0,95$)	Средняя полнота извлечения вещества, %
1	2	3	4	5	6	7	8
Молоко (сырое, питьевое, сухое)	0,001—0,018	35	7,9	11	22	31	111
Молочные смеси для детского питания (сухие, восстановленные, жидкие)	0,005—0,184	33	4	5,3	11	15	102
Сливки	0,001—0,020	31	6,9	9,7	19	27	104
Кефир	0,001—0,016	38	8,1	11,4	23	32	94
Йогурт (без наполнителя)	0,001—0,020	28	4,6	6,4	13	18	103
Йогурт с фруктовыми наполнителями	0,001—0,018	34	7	9,8	20	27	98
Сметана	0,001—0,017	38	7	9,8	20	27	114
Творог	0,001—0,017	42	9,1	12,8	26	36	94
Сыр	0,002—0,042	48	6,3	8,9	18	25	107
Масло из коровьего молока (сливочное)	0,003—0,047	47	5,6	11,4	23	22	87
Мясо скота и птицы	0,002—0,016	30	4,5	6,4	26	18	99

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

Продолжение табл. 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8
Колбасные изделия	0,005—0,037	30	3,8	5,3	11	15	97
Мясные консервы для детского питания	0,005—0,037	30	4,4	6,1	20	17	97
Рыба	0,002—0,017	37	8,5	12,0	24	34	113
Креветки	0,001—0,021	31	6,5	8,9	19	25	97
Яйца	0,004—0,111	35	8,5	11,9	22	33	76
Мёд	0,004—0,091	32	6,9	9,6	13	27	97

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 0,02 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 $\pm 1\%$, 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

Продолжение табл. 4.1

1	2
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 $\pm 0,01$ (не более)	Внесено в реестр «Утверждённые 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, 100 250, 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.

Таблица 4.2

Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Наименование вспомогательного оборудования, устройств, материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее $(50 \pm 1) ^\circ\text{C}$	—
Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	—
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов) или фарфоровые ступки с пестиками	—

1	2
Колбы конические на 50 и 100 см ³ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932
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	—
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 50, 100, 500, 1000 см ³	ГОСТ 25336
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	—
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS) до 20 000 g	—
Шейкер для пробирок вихревого типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 100 об./мин	—
Шейкер (смеситель) переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости до 100 об./мин	—
Шкаф (стол) лабораторный	—
Шпатели или стеклянные палочки	—
Ультразвуковая ванна с эффективной мощностью ультразвука 60 Вт (дополнительно для сухого молока и проб меда)	—
Флаконы стеклянные с завинчивающимися крышками вместимостью не менее 80 см ³	—

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

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

Таблица 4.3

Реактивы

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

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

4.2. Количественное определение антибиотиков тетрациклиновой группы 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-набора³

Наименование компонентов набора	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
1	2
Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсibilизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем	Инструкция к набору
Комплект стандартных концентрированных растворов тетрацилина со следующими концентрациями: 0; 0,5; 1,5; 3,0; 6,0; 18,0 мкг/дм ³ в воде по 1,3 см ³ (6 шт.)	Инструкция к набору
Конъюгат, готовый к употреблению (10 см ³)	Инструкция к набору

³ Тест-набор «RIDASCREEN Tetracyclin».

1	2
Антитела – 6 см ³	Инструкция к набору
Готовая смесь субстрата с хромогеном, содержащая пероксидкарбамида и тетраметилбензидин (10 см ³)	Инструкция к набору
Стоп-реагент, содержащий раствор 1 н серной кислоты (14 см ³)	Инструкция к набору
Буфер 1 для проб для разбавления стандартных растворов и образцов, используется при анализе образцов масла, мёда, мяса, колбасных изделий, рыбы, креветок и яйца (60 см ³)	Инструкция к набору
Буфер 2 для проб для разбавления стандартных растворов и образцов, используется при анализе образцов молока, в том числе сухого, сыра, молочных продуктов (60 см ³)	Инструкция к набору
PBS-буфер (моющий буфер) в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, рН 7,4, содержащей 0,05 % твина (1 пакет)	Инструкция к набору

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

Таблица 4.5.

Пример специфичности тест-набора⁴

Вещество	Специфичность, %
Тетрацилин (вещество стандарта)	100
Хлортетрацилин	70
Ролитетрацилин	34
Демеклоцилин	26
Окситетрацилин	13
Миноцилин	3
Доксицилин	2

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.

⁴ Тест-набор «RIDASCREEN Tetracyclin».

5.2. Проведение исследований допускается только в подготовленном лабораторном помещении.

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

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

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

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

VI. Требования к квалификации операторов

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

VII. Отбор проб

7.1. Отбор проб осуществляют в соответствии с методическим документом⁵.

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.

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

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).

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

Способ 1. Растворяют содержимое целого пакетика в 1 дм³ дистиллированной воды. Готовый 10 мМ моющий буфер может храниться при температуре 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 плюс от 2 до плюс 8 °С в течение 4—6 недель.

9.4.2. Приготовление 1 н раствора гидроокиси натрия.

Для приготовления 1 н раствора гидроокиси натрия навеску 10 г гидроокиси натрия разводят в мерной колбе объемом 250 см³ дистиллированной водой до метки.

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

9.4.3. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия.

Навеску 5 г гидроокиси натрия разводят в мерной колбе объемом 250 см³ 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.

9.4.4. Приготовление 10%-го раствора метанола.

Для получения 10%-го раствора метанола отбирают 10 см³ метанола в мерную колбу объемом 100 см³ и разводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

9.4.5. Приготовление 20%-го растворов метанола.

Для получения 20%-го раствора метанола отбирают 20 см³ метанола в мерную колбу объемом 100 см³ 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.

9.4.6. Приготовление 50 мМ буферного раствора янтарной кислоты.

Навеску 0,59 г янтарной кислоты растворяют примерно в 50 см³ дистиллированной воды, устанавливают рН до 4,0 с помощью 1 н NaOH, доводят до 100 см³ дистиллированной водой.

Буферный раствор янтарной кислоты готовят в необходимом количестве непосредственно перед анализом с соблюдением указанных соотношений компонентов, хранению не подлежит.

9.4.7. Приготовление 20 мМ буферного раствора (PBS-буфер).

Навески натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного 1,10 г, натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного 3,22 г и натрия хлористого 8,77 г растворяют в объеме 800—900 см³ дистиллированной воды, доводят рН до 7,4 0,5 н раствором гидроокиси натрия, далее доводят объем раствора дистиллированной водой в мерной колбе до метки 1 000 см³, тщательно перемешивают.

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

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

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

9.5. Подготовка проб продуктов.

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

9.5.1. Молоко и молочные смеси с содержанием жира < 1,5 % (жидкие, восстановленные).

Молоко и молочные продукты с содержанием жира < 1,5 % разбавляют готовым буфером 2 для проб в соотношении 1 : 10 (1 + 9) в чистой стеклянной пробирке (например, 0,05 см³ молока + 0,45 см³ буфера 2 для проб).

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

9.5.2. Молоко и молочные смеси с содержанием жира > 1,5 % (жидкие, восстановленные).

Образец молока или молочного продукта с содержанием жира $> 1,5\%$ отбирают по $5\text{--}10\text{ см}^3$ в центрифужную пробирку объемом 15 см^3 , центрифугируют 10 мин при 3 000 г и температуре от плюс 4 до плюс $8\text{ }^\circ\text{C}$ (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры от плюс 4 до плюс $8\text{ }^\circ\text{C}$). Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки, из средней части отбирают обезжиренный продукт в пустую пробирку.

Обезжиренный продукт разбавляют готовым буфером 2 для проб в соотношении 1 : 10 (1 + 9) в чистой стеклянной пробирке (например, $0,05\text{ см}^3$ молока + $0,45\text{ см}^3$ буфера 2 для проб).

Для анализа используют $0,05\text{ см}^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10, для сухих продуктов дополнительно учитывают коэффициент восстановления.

9.5.3. Молоко и молочные смеси для детского питания (сухие).

Навеску 10 г исследуемого сухого продукта разводят в 90 см^3 дистиллированной воды, предварительно прогретой примерно до $60\text{ }^\circ\text{C}$, и доводят объем суспензии до 100 см^3 . Тщательно перемешивают встряхиванием и переворачиванием не менее 10 минут до полного растворения сухого молока. Если сухое молоко плохо растворяется, то дополнительно в течение 3 мин выдерживают суспензию в ультразвуковой бане.

Далее центрифугируют 10 мин при 3 000 г и температуре от плюс 4 до плюс $8\text{ }^\circ\text{C}$ (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры от плюс 4 до плюс $8\text{ }^\circ\text{C}$). Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки, из средней части отбирают обезжиренный продукт в пустую пробирку.

Обезжиренный продукт разбавляют готовым буфером 2 для проб в соотношении 1 : 10 (1 + 9) в чистой стеклянной пробирке (например, $0,05\text{ см}^3$ молока + $0,45\text{ см}^3$ буфера 2 для проб).

Для анализа используют $0,05\text{ см}^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10, для сухих продуктов дополнительно учитывают коэффициент восстановления.

9.5.4. Кисломолочные продукты (творог, йогурт (без наполнителя/с фруктовыми наполнителями), кефир, сливки, сметана).

Навеску 5 г исследуемого продукта вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см³, инкубируют 15 минут при температуре 50 °С, например, на водяной бане, перемешивают на вортексе до полной гомогенизации.

Далее центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре от плюс 4 до плюс 8 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры от плюс 4 до плюс 8 °С). Удаляют образовавшийся верхний слой жира с помощью шпателя или стеклянной палочки, из средней части отбирают обезжиренный продукт в пустую пробирку.

Обезжиренный продукт разбавляют готовым буфером 2 для проб в соотношении 1 : 10 (1 + 9) в чистой стеклянной пробирке (например, 0,05 см³ молока + 0,45 см³ буфера 2 для проб).

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

9.5.5. Масло из коровьего молока (сливочное).

Навеску 1 г исследуемого продукта вносят в центрифужную пробирку объёмом 15 см³, расплавляют на водяной бане при температуре около 40 °С.

В пробирку с расплавленной пробой вносят 1 см³ н-гексана и интенсивно перемешивают 1 мин на вортексе, после чего добавляют 1 см³ 20%-го раствора метанола (п. 9.4.5), интенсивно перемешивают на вортексе не менее 10 с, а затем встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Центрифугируют 10 мин при 2 000 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).

Из пробирки осторожно удаляют верхний гексановый слой с помощью автоматической пипетки или пипетки Пастера, приливают 1 см³ н-гексана и интенсивно перемешивают 1 мин на вортексе.

Далее центрифугируют 10 мин при 2 000 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).

Нижнюю водную фазу в количестве 1 см³ переносят в пробирку на 1,5—2 см³ и помещают на лед на 10 минут. После чего центрифугируют

10 мин при 20 000 г при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) и затем нижнюю водную фазу отбирают в пустую пробирку.

Для исследования отобранную нижнюю водную фазу разбавляют в соотношении 1 : 17 (1 + 16) буфером 1 для проб (например, 0,05 см³ пробы + 0,8 см³ буфера 1 для проб) в чистой стеклянной пробирке.

Для анализа используют 0,05 см³ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 20.

Примечание. При проведении пробоподготовки с использованием негексана для исключения ложноположительных результатов необходимо использовать отрицательный контроль. При подготовке 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).

9.5.6. 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 5 г вносят в емкость для гомогенизации, добавляют 20 см³ метанола 10%-го (п. 9.4.4) и гомогенизируют в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Гомогенизированную пробу переносят в центрифужную пробирку на 50 см³ и встряхивают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Далее гомогенизированную пробу центрифугируют 15 мин при 3 000 г и температуре не выше 4 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры не выше 4 °С). Водную (среднюю) фазу в количестве 1 см³ переносят в пробирку на 1,5—2 см³.

Далее пробу центрифугируют 5 мин при 20 000 г при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С), после чего отбирают супернатант в пустую пробирку.

Для исследования полученный супернатант разбавляют в соотношении 1 : 5 (1 + 4) буфером 2 для разбавления проб (например, 0,1 см³ супернатанта + 0,4 см³ буфера 2 для разбавления проб) в чистой стеклянной пробирке.

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

9.5.7. Мясо скота и птицы.

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

Навеску гомогенизированной пробы 1 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3 , добавляют 9 см^3 20 мМ PBS-буфера с рН 7,4 (п. 9.4.7), интенсивно перемешивают 1 мин на вортексе пробу с буфером, а затем перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Гомогенизированную пробу центрифугируют 10 мин при 4 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С), отбирают 1 см^3 супернатанта и переносят его в чистую пробирку.

К 1 см^3 супернатанта добавляют 2 см^3 n-гексана и перемешивают на вортексе не менее 10 с. Далее центрифугируют 10 мин при 4 000 g при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С). Нижнюю водную фазу отбирают в пустую пробирку.

Для анализа используют $0,05 \text{ см}^3$ нижней водной фазы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10.

9.5.8. Продукты из мяса (колбасные изделия; консервы мясные, в том числе для питания детей)

Навеску гомогенизированной пробы 3 г вносят в емкость для гомогенизации, добавляют 30 см^3 20 мМ PBS-буфера с рН 7,4 (п. 9.4.7) и гомогенизируют в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Гомогенизированную пробу равномерно распределяют в центрифужных пробирках объемом 15 см^3 и центрифугируют 10 мин при 4 000 g и температуре от плюс 4 до плюс 8 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры от плюс 4 до плюс 8 °С). Обезжиренную среднюю фракцию отбирают в пустые пробирки.

Полученный фугат разбавляют в соотношении 1 : 2 (1 + 1) буфером 1 для проб (например, $0,5 \text{ см}^3$ супернатанта + $0,5 \text{ см}^3$ буфера 1 для проб) в чистой стеклянной пробирке.

Для анализа используют $0,05 \text{ см}^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 20.

9.5.9. Рыба и креветки.

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

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1 г переносят в центрифужную пробирку объёмом 15 см³ с винтовой крышкой и приливают 9 см³ 20 мМ PBS-буфера с рН 7,4 (п. 9.4.7), интенсивно перемешивают на вортексе, а затем экстракцию проводят встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Центрифугируют 10 мин при 4 000 г и комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С), супернатант отбирают в пустую пробирку.

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

Для образцов с повышенным содержанием жира (более 5 %) добавляют стадию обезжиривания.

К 1 см³ супернатанта добавляют 2 см³ н-гексана и перемешивают на вортексе не менее 10 с. Далее центрифугируют 10 мин при 4 000 г при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С). Нижнюю водную фазу отбирают в пустую пробирку.

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

9.5.10. Яйца (сырые, замороженные)

Тщательно гомогенизируют всё количество представительной пробы в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке, для анализа яйца желток и белок следует гомогенизировать совместно.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 4 г переносят в центрифужную пробирку объёмом 50 см³ и приливают 20 см³ 50 мМ буферного раствора янтарной кислоты (п. 9.4.6). Для экстракции перемешивают пробу встряхиванием 15 мин при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С).

Центрифугируют 15 мин при 4 000 г при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С), супернатант отбирают в пустую пробирку.

Супернатант разбавляют в соотношении 1 : 10 (1 + 9) 20 мМ PBS-буфером с рН 7,4 (п. 9.4.7) (например, 0,1 см³ супернатанта + 0,9 см³ 20 мМ PBS-буфера) в чистой стеклянной пробирке.

Для анализа используют 0,05 см³ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 60.

9.5.11. Мёд.

Навеску меда 1 г отбирают в стеклянный флакон с винтовой крышкой (емкостью не менее 80 см³), разбавляют в соотношении 1 : 50 (1 + 49) 20 мМ PBS-буфером, рН 7,4 (п. 9.4.7) (например, 1 г мёда + 50 см³ 20 мМ PBS-буфера).

Пробы мёда, которые трудно растворяются, дополнительно инкубируют 5 мин в ультразвуковой бане.

Разбавленную пробу интенсивно перемешивают на вортексе не менее 2 мин.

Непосредственно перед анализом пробирки с пробами необходимо встряхнуть несколько раз вверх-вниз.

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

Х. Проведение измерений

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

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

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

10.2. Подготовка тест-набора к исследованиям.

10.2.1. Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов (8 микролунок, скрепленных в одну 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. Подготовка реагентов к исследованиям.

Стандартные растворы поставляются в виде концентратов. Чтобы получить готовые к использованию стандартные растворы, необходимо разбавить в 10 раз стандартные концентрированные растворы соответствующим буфером для проб (например, $0,05 \text{ см}^3$ концентрированного стандарта + $0,45 \text{ см}^3$ буфера) и тщательно перемешать. Использовать стеклянные пробирки.

Для масла, мёда, мяса, колбасных изделий, рыбы, креветок и яиц использовать при разбавлении концентратов буфер 1 для проб.

Для молока и сухого молока, сыра, молочных продуктов использовать при разбавлении концентратов буфер 2 для проб.

10.4. Алгоритм проведения исследования.

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

10.4.2. Добавляют в выбранные пары лунок по $0,05 \text{ см}^3$ каждой концентрации раствора стандарта, раствора подготовленной пробы продукта.

10.4.3. Затем в каждую лунку добавляют по $0,05 \text{ см}^3$ раствора анти-тел к тетрациклину. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25 °С) в течение 1 часа в темном месте.

10.4.4. По окончании инкубации выливают жидкость из лунок, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капельки жидко-

сти, оставшиеся в лунках, путем троекратного интенсивного постукивания рамкой с лунками по столу (максимально выбивая капли из лунок), накрытому фильтровальной бумагой.

10.4.5. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер по п. 9.4.1), внося по $0,25 \text{ см}^3$ в каждую лунку, используя восьмиканальный дозатор. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, после чего выливают жидкость из лунок и тщательно выбивают капельки жидкости из лунок, как описано выше в п. 10.4.4. Процедура отмывки повторяется трижды.

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

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

10.4.6. После отмывания добавляют по $0,1 \text{ см}^3$ смеси ферментного конъюгата 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.

10.4.7. 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.

10.4.8. Повторяют процедуру отмывки: заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер по п. 9.4.1), внося по $0,25 \text{ см}^3$ в каждую лунку, используя восьмиканальный дозатор. Далее проводят отмывку, как описано выше в п. 10.4.5. Процедура отмывки повторяется трижды.

10.4.9. 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.

10.4.10. Далее измеряют оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм с помощью фотометра планшетного (микропланшетного иммуноферментного анализатора). Время от внесения стоп-реагента до измерения не должно превышать 30 мин.

XI. Обработка результатов измерений

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

Величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,8 ($A_{450\text{нм}} < 0,8$) 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:

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

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:

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

X – концентрация антибиотика в пробе, нг/кг (нг/дм³);

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 ($i = 2...6$) (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 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) 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 антибиотиков
тетрациклиновой группы в различных пробах**

Образец	Фактор разбавления
Молоко (жидкое)	10
Молочные смеси для детского питания (восстановленные, жидкие)	10
Молочные смеси для детского питания (сухие)	$10 \times K$ (коэффициент восстановления)
Йогурт (с наполнителями и без), кефир, сливки	10
Творог, сметана	10
Масло из коровьего молока (сливочное)	20
Сыр	25
Мясо скота и птицы	10
Колбасные изделия, консервы мясные для детского питания	20
Рыба, креветки	10
Яйца (сырые, замороженные)	60
Мёд	50

**ХII. Проверка приемлемости результатов
параллельных определений**

12.1. При расчёте учитывают только результаты, удовлетворяющие условиям диапазона определяемых концентраций антибиотика в образце (значение равно или выше нижней границы / равно или ниже верхней границы) для соответствующего вида продукции, указанного в 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, устранив их и вновь выполняют анализ.

XIII. Оформление результатов

13.1. Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, с учетом границы абсолютной погрешности результат анализа представляют в виде: «Содержание антибиотиков тетрациклиновой группы в молоке $< 0,001$ мг/дм³».

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), 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 в вращения ротора, об./мин;

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

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

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

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

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

Пример.

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

Способ 1 – путем расчета по формуле (2).

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

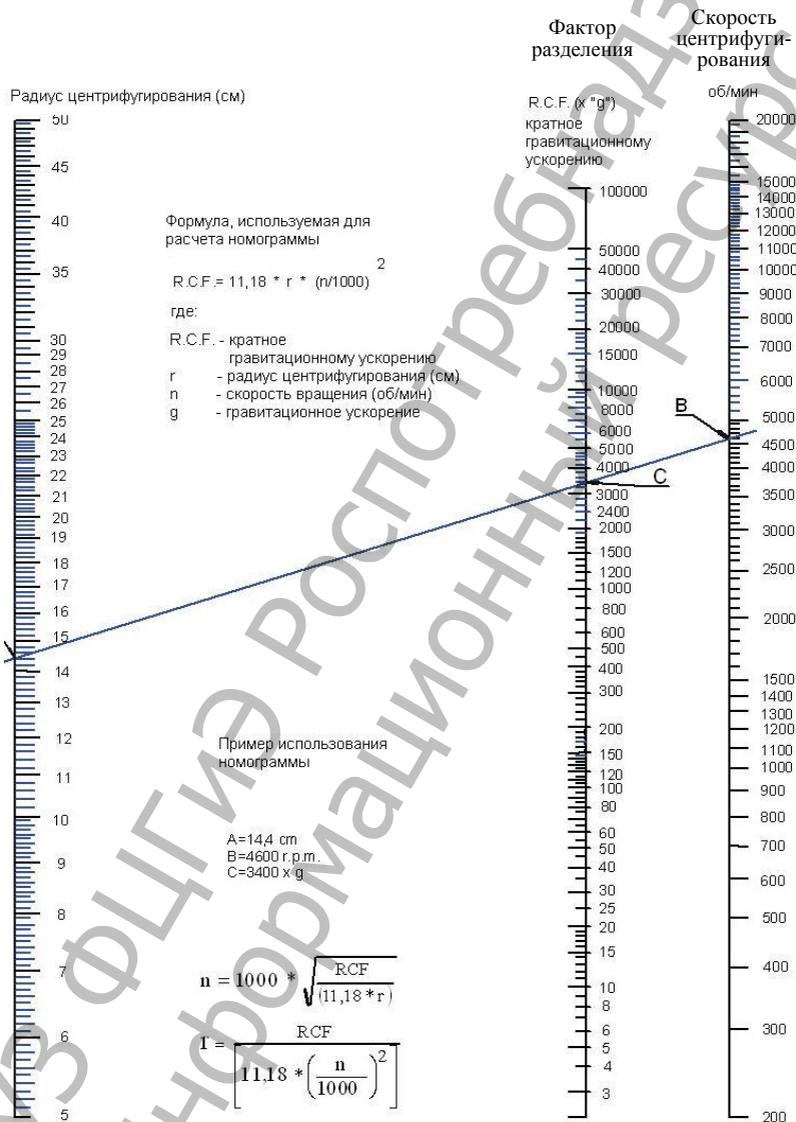
Таким образом, для получения фактора разделения 4000 g необходимо установить скорость центрифугирования примерно 6700 об./мин.

Способ 2 – с использованием номограммы.

На номограмме проводим 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 4328 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия».

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа

**Методические указания
МУК 4.1.3680—20**

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 13.12.2021

Формат 60x88/16

Тираж 100 экз.

Печ. л. 2,0
Заказ 82

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