ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57025— 2016

РЫБА, НЕРЫБНЫЕ ОБЪЕКТЫ И ПРОДУКЦИЯ ИЗ НИХ

Иммуноферментный метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 300 «Рыбные продукты пищевые, кормовые, технические и упаковка»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 августа 2016 г. № 926-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 16 Федерального закона «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

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

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины, определения и сокращения . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Предел обнаружения суммарного содержания трифенилметановых красителей . . . 2
6 Требования безопасности и условия выполнения измерений . . . 3
7 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы . . . 3
8 Подготовка к выполнению измерений . . . 4
8.1 Подготовка оборудования . . . 4
8.2 Приготовление растворов . . . 5
8.3 Отбор проб . . . 7
8.4 Подготовка проб . . . 7
9 Проведение иммуноферментного анализа . . . 8
10 Обработка результатов измерения . . . 10
Приложение А (обязательное) Комплектация тест-системы 1 . . . 12
Приложение Б (обязательное) Комплектация тест-системы 2 . . . 13
Приложение В (рекомендуемое) Схема заполнения лунок планшета . . . 14

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РЫБА, НЕРЫБНЫЕ ОБЪЕКТЫ И ПРОДУКЦИЯ ИЗ НИХ

Иммуноферментный метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей

Fish, non-fish objects and products from them. Immunoenzyme method of determination of the triphenylmethane dyes

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на рыбу, нерыбные объекты (ракообразные, моллюски) и продукцию из них и устанавливает иммуноферментный метод определения остаточного суммарного содержания трифенилметановых красителей (малахитовый зеленый, лейкомалахитовый зеленый, кристаллический фиолетовый, бриллиантовый зеленый).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

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

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 334 Бумага масштабно-координатная. Технические условия

ГОСТ 908 Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042, ИСО 4788) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2652 Калия бихромат технический. Технические условия

ГОСТ 3652 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 3760 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

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

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

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

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 31339 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ Р 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **тест-система:** Набор (комплект) специально подобранных реагентов (реактивов) и составных частей, предназначенный для определения одного или нескольких конкретных веществ.

3.1.2 **вспомогательный раствор:** Раствор, приготовляемый заблаговременно и необходимый для приготовления других типов растворов.

3.1.3 **рабочий раствор:** Раствор одного или нескольких реактивов, приготовляемый непосредственно перед использованием и необходимый для выполнения процедуры анализа.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

ИФА — иммуноферментный анализ;
ОП — оптическая плотность;
АГ — антиген;
АТ — антитела;
ФК — ферментный конъюгат;
П — относительное поглощение;
КФ — кристаллический фиолетовый;
БЗ — бриллиантовый зеленый;
МЗ — малахитовый зеленый;
ЛМЗ — лейкомалахитовый зеленый;
ДДБ — 2,3-дихлоро-5,6-дициано-пара-бензохинон.

4 Сущность метода

4.1 Иммуноферментный метод позволяет определять суммарное содержание трифенилметановых красителей в рабочих растворах экстрактов исследуемых проб с помощью твердофазного конкурентного ИФА.

4.2 Непрямой твердофазный конкурентный ИФА основан на способности трифенилметановых красителей (МЗ) взаимодействовать со специфичными АТ, полученными против МЗ, в условиях конкуренции с белковым конъюгатом МЗ, нанесенным на поверхность лунок планшета, — твердофазным АГ.

4.3 Связавшиеся с твердой фазой АТ выявляют путем измерения интенсивности окрашивания конечного продукта реакции: вторичных антивидовых АТ, меченных пероксидазой хрена, с субстрат-хромогенной смесью.

Аналитический сигнал (регистрируемое значение ОП), характеризующий степень взаимодействия АТ с АГ, обратно пропорционален содержанию трифенилметановых красителей в растворе.

5 Предел обнаружения суммарного содержания трифенилметановых красителей

5.1 Наименьшие пределы определения трифенилметановых красителей представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Пределы определения трифенилметановых красителей

Определяемый компонент	Предел определения, мкг/кг	
	Тест-система 1	Тест-система 2
МЗ	0,25	1,00

5.2 Специфичность АТ, применяемых для определения суммарного содержания трифенилметановых красителей, выраженная в коэффициентах перекрестного реагирования, представлена в таблице 2.

Таблица 2 — Специфичность АТ, применяемых для определения массовой концентрации трифенилметановых красителей

Определяемый компонент	Коэффициент перекрестного реагирования, %
МЗ	100
КФ	110
БЗ	40
ЛМЗ (после окисления)	100

5.3 Расхождение между результатами двух параллельных определений, полученных в условиях повторяемости, может превышать предел повторяемости *r* не более одного раза из двадцати.

6 Требования безопасности и условия выполнения измерений

6.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

6.2 Помещения, в которых проводится анализ и подготовка проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией и соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и электробезопасности по ГОСТ Р 12.1.019.

6.3 К выполнению измерений допускаются лица, владеющие техникой ИФА и изучившие инструкции по применению тест-систем и инструкции по эксплуатации используемых приборов.

6.4 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха ..... от 20 °С до 30 °С;
- атмосферное давление ..... от 84 до 106 кПа;
- напряжение в питающей электросети ..... от 200 до 240 В;
- частота переменного тока ..... от 49 до 51 Гц;
- относительная влажность воздуха ..... от 40 % до 80 %.

7 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы

7.1 При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, аппаратуру, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой погрешности ±0,001 г;
- весы микроаналитические с наибольшим пределом взвешивания 52 г, с пределом абсолютной допускаемой погрешности не более ±0,01 мг;
- pH-метр любой марки, позволяющий проводить измерения в диапазоне от 3 до 10 ед. pH с погрешностью ±0,05 ед. pH;
- фотометр вертикального типа фотометрирования с диапазоном измерений ОП от 0 до 3 в комплекте с интерференционным светофильтром для длины волны 450 нм;
- бумагу масштабно-координатную по ГОСТ 334, марки Н-1;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;
- калькулятор любого типа с логарифмической функцией;

- картридж для твердофазной экстракции объемом не менее 3 $см^3$, заполненный катионообменным сорбентом с диаметром частиц не менее 50 мкм;
- морозильную камеру любого типа, обеспечивающую среднюю температуру в холодильной камере не выше минус 20 °С;
- роторный испаритель любого типа или устройство для испарения экстрактов, с термостатируемым нагревательным модулем с системой отдувки растворителей инертным газом;
- систему получения деионизованной воды высокой чистоты;
- термостат любого типа, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;
- устройство вакуумное для твердофазной экстракции;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 8 °С;
- центрифугу с бакет-ротором и адаптером для пробирок типа «Фалькон» вместимостью 15 и 50 $см^3$ и частотой вращения от 3000 до 10000 об/мин;
- шейкер переворачивающий вертикального вращения 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об/мин;
- шейкер вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2500 об/мин;
- шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий поддержание температуры не менее (95 ± 5) °С;
- колбы 1(2)-10(25, 50, 100, 250,1000)-2 по ГОСТ 1770;
- колбы конические Кн-1-50-24/29 ТС и Кн-2-50-18 ТС по ГОСТ 25336;
- пипетки многоканальные переменной вместимости 0,03—0,30 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ±1,0 %;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 0,02—0,20; 0,1—1,0; 0,5—5,0; 1—10 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ±1,0 %;
- пробирки стеклянные типа «Фалькон» вместимостью 15 и 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками;
- пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 $см^3$;
- цилиндры 1(2, 3)-10(50, 100, 250)-1 по ГОСТ 1770.

7.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы:

- 2,3-дихлоро-5,6-дициано-пара-бензохинон (ДДБ) с массовой долей основного вещества не менее 99 %;
- аммиак по ГОСТ 3760;
- ацетонитрил для хроматографии, о. с. ч., с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- воду деионизованную, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709;
- калия бихромат по ГОСТ 2652;
- кислоту лимонную по ГОСТ 908, ГОСТ 3652;
- кислоту серную концентрированную по ГОСТ 4204;
- метанол по ГОСТ 6995, х. ч.;
- натрия гидрофосфат безводный по ГОСТ 4172, х. ч.;
- н-гексан с содержанием основного вещества не менее 98 %, х. ч.;
- тест-системы для твердофазного конкурентного ИФА в комплектации (см. приложение А и Б), которые предназначены для суммарного определения массовой доли трифенилметановых красителей с пределом обнаружения:

тест-система 1: 0,25 мкг/кг;

тест-система 2: 1,00 мкг/кг;

- этилацетат с содержанием основного вещества не менее 99 %, х. ч. по ГОСТ 8981.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Подготовка оборудования

8.1.1 При подготовке к проведению измерений 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, установленном в вытяжном шкафу.

8.1.2 Подготовку и проверку фотометра и pH-метра проводят в соответствии с руководствами по эксплуатации приборов.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление растворов для тест-системы 1

8.2.1.1 Приготовление раствора реагента А

В мерную колбу вместимостью 25 см^3 вносят 6,25 см^3 раствора № 4 (см. приложение А), доводят объем до метки ацетонитрилом и перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.1.2 Приготовление рабочего буферного раствора

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 5 см^3 ацетонитрила, доводят объем до метки раствором № 2 (см. приложение А) и перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.1.3 Приготовление рабочего раствора буфера для промывки

В мерную колбу вместимостью 250 см^3 вносят 50 см^3 раствора № 1 (см. приложение А), доводят объем до метки деионизованной водой и перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.1.4 Приготовление рабочего раствора ферментного конъюгата

В пробирку вместимостью 15 см^3 вносят 0,6 см^3 раствора № 9 (см. приложение А), добавляют 14,4 см^3 раствора № 3 (см. приложение А). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.1.5 Приготовление рабочих градуировочных растворов МЗ K_0—K_5

а) Приготовление исходного раствора МЗ K_6

Для приготовления исходного раствора K_6 с концентрацией МЗ 0,5 нг/см^3 в пробирку вместимостью 15 см^3 вносят 3,98 см^3 рабочего буферного раствора (см. 8.2.1.2) и 0,02 см^3 раствора № 7 (см. приложение А), перемешивают на шейкере в течение 30 с.

б) Приготовление рабочих градуировочных растворов МЗ K_0—K_5

Рабочие градуировочные растворы K_0—K_5 готовят в пробирках типа «Эппендорф» согласно таблице 3.

Таблица 3 — Приготовление рабочих градуировочных растворов K_0—K_5

Обозначение и массовая концентрация приготовляемого раствора МЗ	Вносимый объем, см^3			
	рабочего буферного раствора (8.2.1.2)	исходного раствора K_6	рабочего раствора K_4	рабочего раствора K_2
K_5 (0,2 нг/см^3)	0,6	0,4	—	—
K_4 (0,05 нг/см^3)	0,9	0,1	—	—
K_3 (0,02 нг/см^3)	0,6	—	0,4	—
K_2 (0,01 нг/см^3)	0,8	—	0,2	—
K_1 (0,005 нг/см^3)	0,5	—	—	0,5
K_0 (0 нг/см^3)	1,0	—	—	—

Пробирки закрывают крышками и перемешивают на шейкере в течение 20 с.

Используют свежеприготовленные растворы.

8.2.2 Приготовление растворов для тест-системы 2

8.2.2.1 Приготовление раствора лимонной кислоты с молярной концентрацией 0,1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 19,2 г лимонной кислоты, приливают порциями деионизованную воду, тщательно перемешивают и доводят объем до метки деионизованной водой.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

8.2.2.2 Приготовление раствора гидрофосфата натрия с молярной концентрацией 0,2 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 28,4 г гидрофосфата натрия, приливают порциями деионизованную воду, тщательно перемешивают и доводят объем до метки деионизованной водой.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 1 мес.

8.2.2.3 Приготовление буферного раствора по Макилвейну с pH (2,6 ± 0,1)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 89,1 см^3 раствора лимонной кислоты (см. 8.2.2.1) и 10,9 см^3 раствора гидрофосфата натрия (см. 8.2.2.2), контролируя значение pH с помощью pH-метра, перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре от 2 °С до 8 °С — не более одной недели.

8.2.2.4 Приготовление рабочего буферного раствора

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 9 см^3 реакционного буферного раствора № 5 (см. приложение Б), добавляют 1 см^3 метанола, перемешивают и закрывают притертой пробкой.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.2.5 Приготовление раствора ДДБ с молярной концентрацией 0,01 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 113,7 мг ДДБ, растворяют в небольшом количестве ацетонитрила, затем доводят раствор до метки этим же растворителем.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.2.6 Приготовление вспомогательного раствора 1 (ВР1)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 50 см^3 буферного раствора (см. 8.2.2.3) и доводят раствор до метки ацетонитрилом.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.2.7 Приготовление вспомогательного раствора 2 (ВР2)

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 5 см^3 аммиака и доводят раствор до метки метанолом.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.2.8 Приготовление рабочего раствора буфера для промывки

В колбу вместимостью 100 см^3 вносят 95 см^3 деионизованной воды, добавляют 5 см^3 раствора № 2[1)] (см. приложение Б), перемешивают на шейкере в течение 2 мин.

Раствор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С. Срок годности — 1 мес.

8.2.2.9 Приготовление рабочего раствора ферментного конъюгата

В пробирку вместимостью 15 см^3 вносят 1,8 см^3 раствора № 5 (см. приложение Б) и 0,2 см^3 раствора № 4 (см. приложение Б), аккуратно перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.2.10 Приготовление рабочих градуировочных растворов МЗ K_0—K_4

а) Приготовление исходного раствора МЗ K_5

Для приготовления исходного раствора K_5 с концентрацией МЗ 12,8 нг/см^3 в пробирку, вместимостью 15 см^3 вносят 0,9 см^3 раствора № 5 и 0,1 см^3 раствора № 3 (см. приложение Б), перемешивают на шейкере в течение 30 с.

б) Приготовление рабочих градуировочных растворов МЗ K_0—K_4

Рабочие градуировочные растворы K_0—K_4 готовят в пробирках вместимостью 15 см^3 согласно таблице 4.

Таблица 4 — Приготовление рабочих градуировочных растворов K_0—K_5

Обозначение и массовая концентрация приготовляемого раствора МЗ	Вносимый объем, см^3				
	рабочего буферного раствора (8.2.2.4)	исходного раствора K_5	рабочего раствора K_4	рабочего раствора K_3	рабочего раствора K_2
K_4 (3,2 нг/см^3)	0,75	0,25	—	—	—
K_3 (1,6 нг/см^3)	0,5	—	0,5	—	—
K_2 (0,8 нг/см^3)	0,5	—	—	0,5	—
K_1 (0,4 нг/см^3)	0,5	—	—	—	0,5
K_0 (0 нг/см^3)	1,0	—	—	—	—

Пробирки закрывают крышками и перемешивают на шейкере в течение 20 с.

Используют свежеприготовленные растворы.

[1)] При хранении раствора № 2 могут образовываться кристаллы, поэтому перед отбором аликвоты данного реактива необходимо слабо подогреть пробирку с ним при температуре 37 °С в водяной бане или в термостате до полного растворения кристаллов.

8.3 Отбор проб

8.3.1.1 Отбор проб рыбы, нерыбных объектов и продукции из них — по ГОСТ 31339.

8.3.1.2 Срок хранения отобранных проб при температуре от 2 °С до 8 °С — двое суток. При отсутствии возможности исследования проб в течение двух суток образцы должны быть заморожены при температуре минус 20 °С со сроком хранения не более двух месяцев.

8.4 Подготовка проб

Перед началом анализа пробы достают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин.

Пробы рыбы предварительно очищают от крупных костей и кожи, креветки — от хитина и других нецелевых составляющих, измельчают на гомогенизаторе.

8.4.1 Подготовка проб для тест-системы 1

5,00 г гомогенизированной пробы помещают в стеклянную пробирку вместимостью 50 см^3. Затем обрабатывают испытуемые пробы и градуировочные растворы, приготовленные по 8.2.1.5.2, как указано на рисунке 1.

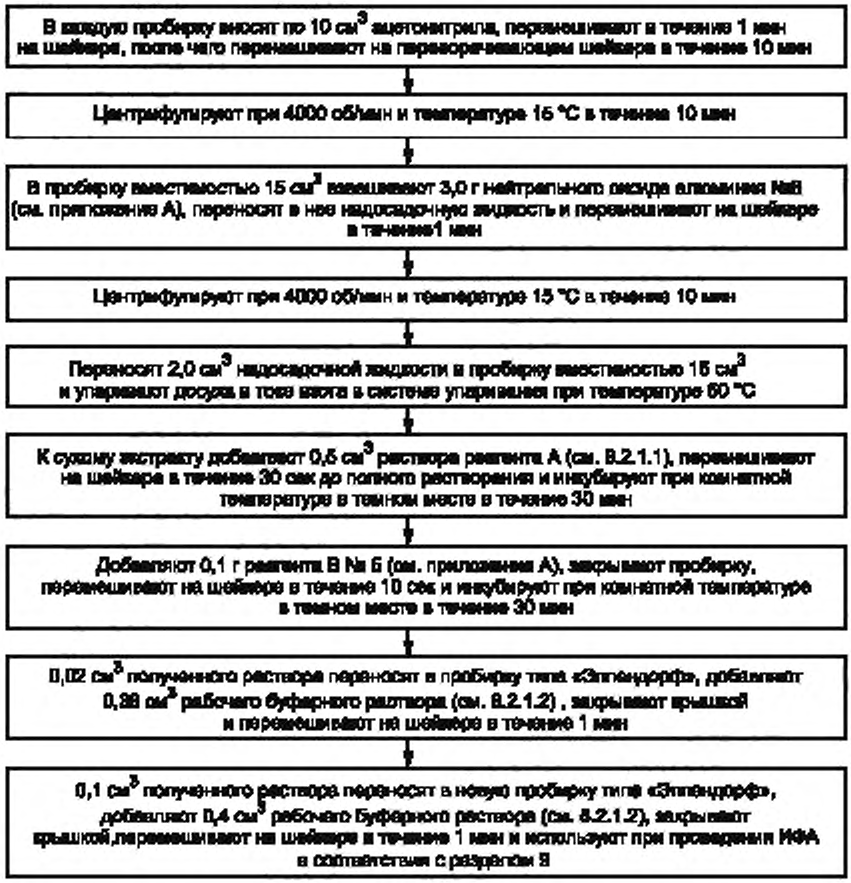


Рисунок 1 — Обработка испытуемых проб и градуировочных растворов для тест-системы 1

8.4.2 Подготовка проб для тест-системы 2

1,00 г гомогенизированной пробы помещают в стеклянные пробирки вместимостью 15 см^3. Затем обрабатывают испытуемые пробы и градуировочные растворы, приготовленные по 8.2.2.10, как указано на рисунке 2.

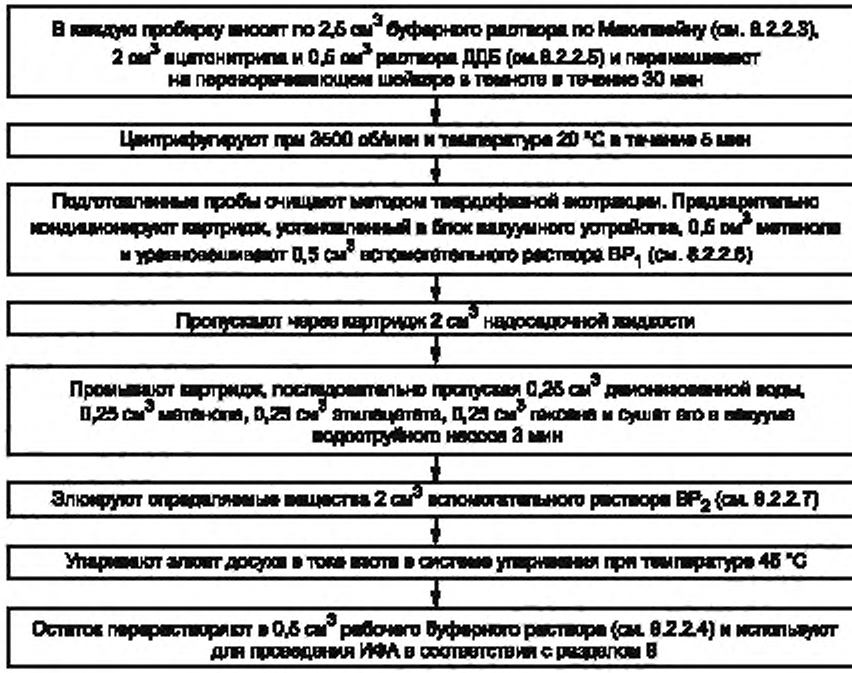


Рисунок 2 — Обработка испытуемых проб и градуировочных растворов для тест-системы 2

9 Проведение иммуноферментного анализа

9.1 Общие положения

9.1.1 При проведении испытаний следует использовать реагенты и компоненты, входящие в один и тот же набор (тест-систему). Разбавление или замена реагентов из набора (тест-системы) другой серии не допускается.

9.1.2 Наборы (тест-системы) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в пределах срока годности.

9.1.3 Окрашивание раствора хромогена (раствор № 10, приложение А) или раствора субстрата № 6 (см. приложение Б) является признаком их порчи и делает невозможным их применение для анализа.

9.2 Подготовка набора (тест-системы) к проведению анализа

9.2.1 Перед использованием тест-систему вынимают из холодильника и выдерживают в темном месте (в ящике стола или в шкафу) при комнатной температуре не менее 30 мин, после чего осторожно встряхивают каждый флакон.

9.2.2 После использования реагенты тест-системы сразу убирают в холодильник.

9.2.3 На всех стадиях необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

9.2.4 Для каждого реактива и раствора используют отдельные съемные наконечники пипеток переменной вместимости. Внесение растворов в лунки проводят осторожно, не касаясь наконечниками их дна и стенок.

9.2.5 Каждый исследуемый экстракт испытуемых проб (см. 8.4) и рабочие градуировочные растворы (см. 8.2.1.5, 8.2.2.10) анализируют в двух повторностях.

Примечание — Далее приведены расходы реактивов на два стрипа, что достаточно для анализа двух исследуемых проб. Для другого числа проб количество используемых стрипов и смешиваемых объемов реагентов изменяют в соответствии с количеством исследуемых проб.

9.2.6 Вскрывают вакуумную упаковку планшета. Из планшета извлекают необходимое число стрипов (полосок по 8 лунок). Неиспользованные стрипы тщательно заклеивают пленкой для заклеивания планшетов и хранят в упаковке при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности тест-системы.

9.3 Проведение анализа с помощью тест-системы 1

Анализ экстрактов испытуемых проб и рабочих градуировочных растворов проводят в соответствии с рисунком 3.

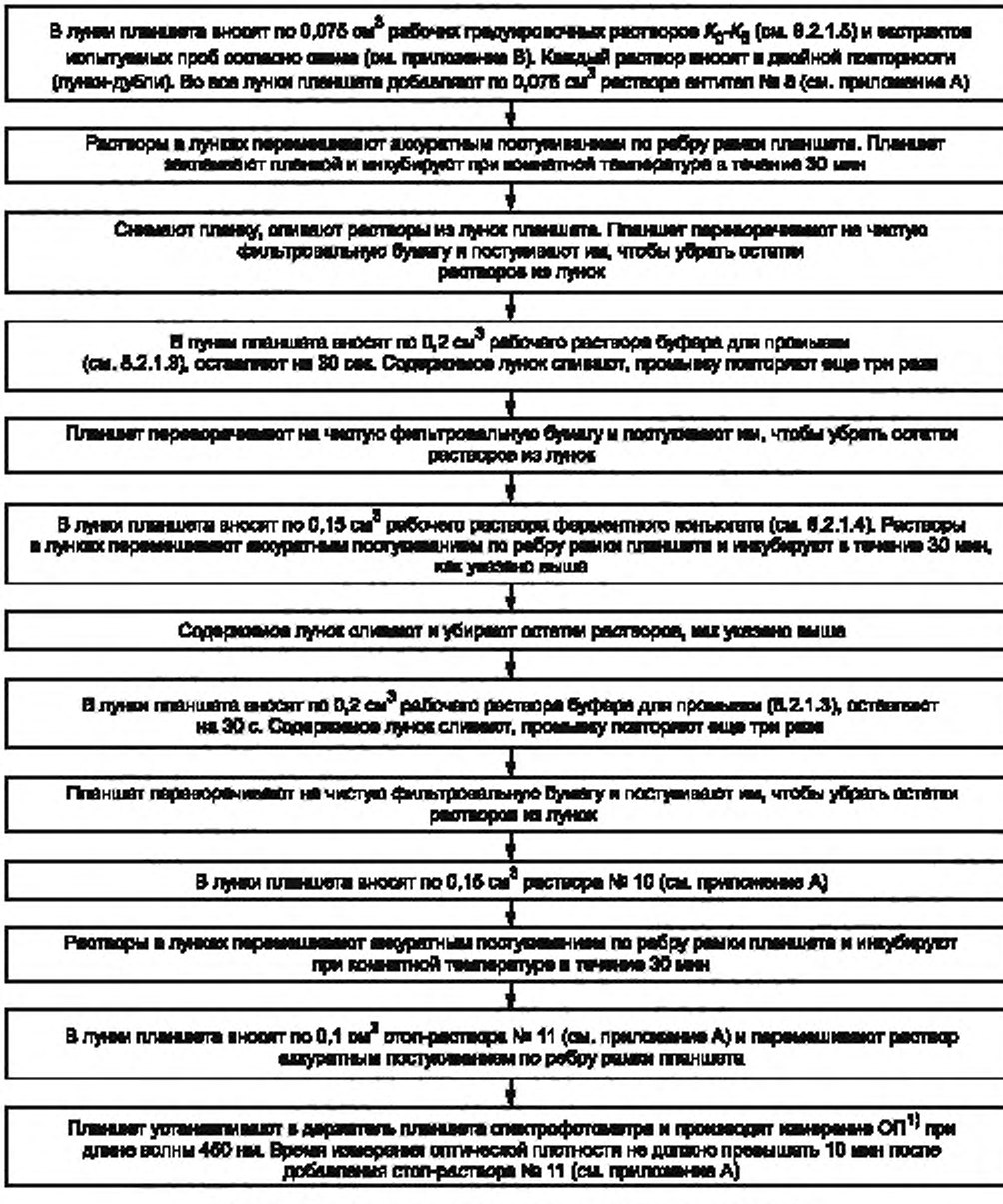


Рисунок 3 — Проведение анализа с помощью тест-системы 1

1) Считывать значения оптической плотности необходимо в течение 10 минут после добавления стоп-раствора № 11.

9.4 Проведение анализа с помощью тест-системы 2

Анализ экстрактов испытуемых проб и рабочих градуировочных растворов проводят в соответствии с рисунком 4.

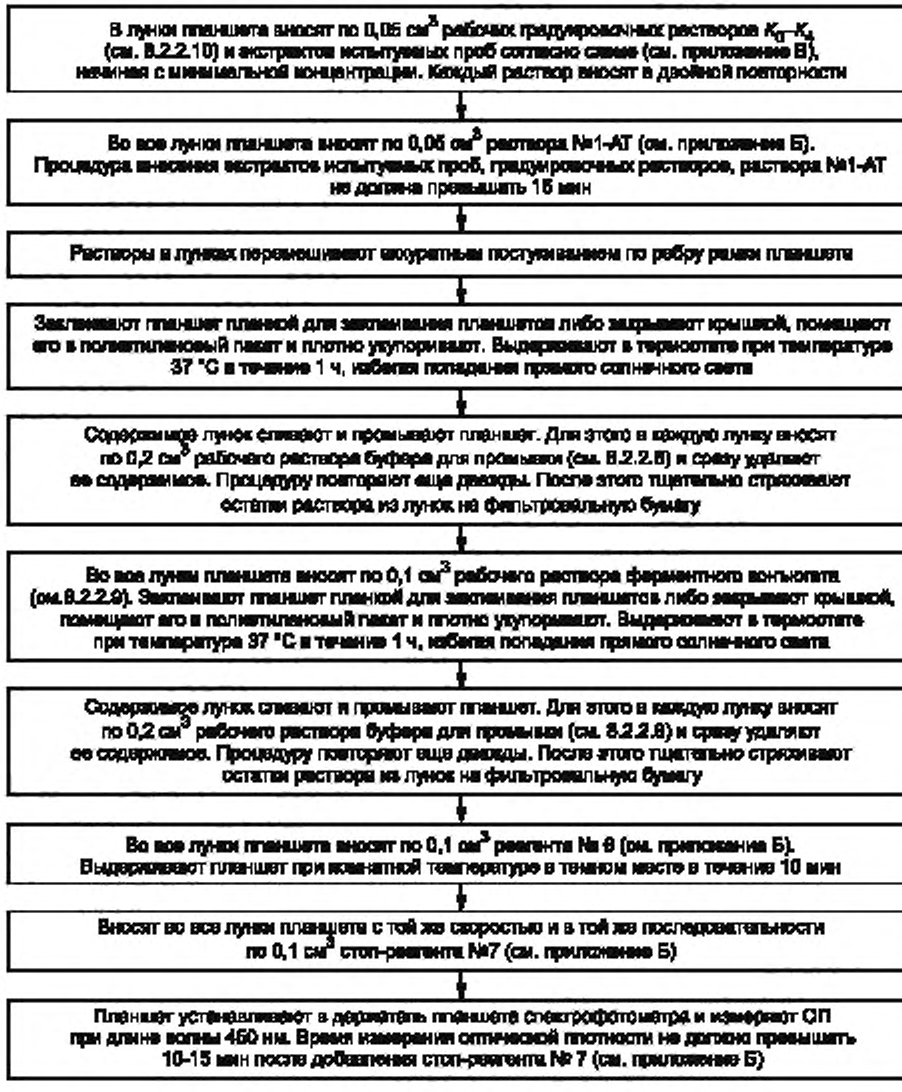


Рисунок 4 — Проведение анализа с помощью тест-системы 2

10 Обработка результатов измерения

10.1 По показателям ОП в лунках-дублях находят среднеарифметические значения. Разность значений ОП для них в процентах от среднего не должна превышать 10.

Связывание АТ (или относительное поглощение) П, %, вычисляют по формуле

$$П = \frac{ОП_к}{ОП_0} \cdot 100, \quad (1)$$

где $ОП_к$ — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочными растворами МЗ $K_5 - K_1$ (см. 8.2.1.5) или $K_4 - K_1$ (см. 8.2.2.10) или экстрактами анализируемых проб.

$ОП_0$ — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочным раствором K_0 (см. 8.2.1.5) для тест-системы 1 и реактивом № 5 (см. приложение Б) для тест-системы 2.

По значениям процентов связывания, вычисленным для градуировочных растворов и соответствующим известным значением массовой концентрации МЗ (нг/см^3), строят градуировочный график в полулогарифмической системе координат.

10.2 Для построения градуировочного графика используют масштабно-координатную бумагу. На ось абсцисс наносят значения логарифмов концентраций МЗ в рабочих разведениях градуировочных растворов K_5—K_1 (см. 8.2.1.5) или K_4—K_1 (см. 8.2.2.10). По оси ординат откладывают значения процентов связывания, рассчитанные для массовых концентраций по формуле (1) и строят градуировочный график с использованием линейной зависимости.

10.3 С помощью градуировочного графика по значению процента связывания, полученного для растворов экстрактов испытуемых проб, находят логарифм массовой концентрации трифенилметановых красителей. С помощью калькулятора вычисляют его обратное значение (антилогарифм), соответствующее массовой концентрации определяемого трифенилметанового красителя в растворе экстракта.

10.4 Содержание трифенилметановых красителей C в анализируемой пробе, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$C = c \cdot K, \quad (2)$$

где c — массовая концентрация трифенилметановых красителей в экстракте анализируемой пробы, определяемая по градуировочному графику, мкг/дм^3;

K — коэффициент пересчета мкг/дм^3 в экстракте анализируемой пробы в мкг/кг, учитывающий как разведение, так и степень извлечения трифенилметановых красителей и равный 50 для тест-системы 1 и 1,25 для тест-системы 2.

Результаты измерений содержания трифенилметановых красителей, мкг/кг, округляют до двух значащих цифр после запятой.

10.5 Допускается использование программного обеспечения, позволяющего определять массовую концентрацию (содержание) трифенилметановых красителей в анализируемой пробе по средним значениям ОП, измеренным в лунках с градуировочными растворами и экстрактами анализируемых проб.

С помощью компьютерной системы обработки данных строят градуировочную зависимость оптической плотности раствора от массовой концентрации МЗ и аппроксимируют линейной функцией.

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

Положительными считают пробы, показавшие значения содержания МЗ выше предела количественного определения (мкг/кг).

Приложение А
(обязательное)

Комплектация тест-системы 1

В комплектацию тест-системы входят:

Планшет 96-луночный полистироловый стрипованный, сенсибилизированный антигеном, готовый для использования.

Растворы:

№ 1 — буфер отмывочный, 5-кратный концентрат, маркированный «Буфер-ОТ»;

№ 2 — буфер для разведения образцов;

№ 3 — буфер для разведения ферментного конъюгата;

№ 4 — раствор для подготовки образцов к анализу, маркированный «Реагент А», 4-кратный концентрат;

№ 5 — порошок для подготовки образцов к анализу, маркированный «Реагент В»;

№ 6 — нейтральный оксид алюминия, фракция 100—200 меш;

№ 7 — градуировочный раствор с содержанием МЗ 100 мкг/кг, маркированный «C_0»;

№ 8 — антитела, специфичные к МЗ;

№ 9 — конъюгат МЗ с пероксидазой хрена, 25-кратный концентрат;

№ 10 — смесь субстрата и хромогена;

№ 11 — стоп-раствор-1 н. раствор соляной кислоты.

Приложение Б
(обязательное)

Комплектация тест-системы 2

В комплектацию тест-системы входят:

Планшет 96-луночный полистироловый стрипованный, сенсибилизированный антигеном, готовый для использования.

Растворы:

№ 1 — антитела к малахитовому зеленому, прозрачная опалесцирующая жидкость кремового цвета, готовая для использования, 6,0 $см^3$;

№ 2 — раствор фосфатного буфера с добавлением твина-20 (20-кратный концентрат), pH 7,2 ± 0,5, прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 $см^3$;

№ 3 — раствор малахитового зеленого с концентрацией 128 нг/мл, 1 $см^3$;

№ 4 — конъюгат антивидовых антител с пероксидазой хрена (10-кратный концентрат), прозрачная бесцветная жидкость, 2,0 $см^3$;

№ 5 — реакционный буферный раствор с добавлением твина-20 и бычьего сывороточного альбумина, pH 7,0—7,4, стерильный, прозрачная бесцветная жидкость, 20,0 $см^3$;

№ 6 — раствор субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметил-бензидина с добавлением перекиси водорода, прозрачная бесцветная жидкость, готовая для использования, 11,0 $см^3$;

№ 7 — стоп-реагент — раствор серной кислоты с молярной концентрацией 0,5 М, прозрачная бесцветная жидкость, готовая для использования, 11,0 $см^3$.

Приложение В
(рекомендуемое)

Схема заполнения лунок планшета

Внесение реагентов следует проводить согласно следующей схеме:

для тест-системы 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	К0	К0	№ 2	№ 2	№ 10	№ 10	№ 18	№ 18	№ 26	№ 26	№ 34	№ 34
B	К1	К1	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11	№ 19	№ 19	№ 27	№ 27	№ 35	№ 35
C	К2	К2	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12	№ 20	№ 20	№ 28	№ 28	№ 36	№ 36
D	К3	К3	№ 5	№ 5	№ 13	№ 13	№ 21	№ 21	№ 29	№ 29	№ 37	№ 37
E	К4	К4	№ 6	№ 6	№ 14	№ 14	№ 22	№ 22	№ 30	№ 30	№ 38	№ 38
F	К5	К5	№ 7	№ 7	№ 15	№ 15	№ 23	№ 23	№ 31	№ 31	№ 39	№ 39
G	К6	К6	№ 8	№ 8	№ 16	№ 16	№ 24	№ 24	№ 32	№ 32	№ 40	№ 40
H	№ 1	№ 1	№ 9	№ 9	№ 17	№ 17	№ 25	№ 25	№ 33	№ 33	№ 41	№ 41

для тест-системы 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	К0	К0	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11	№ 19	№ 19	№ 27	№ 27	№ 35	№ 35
B	К1	К1	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12	№ 20	№ 20	№ 28	№ 28	№ 36	№ 36
C	К2	К2	№ 5	№ 5	№ 13	№ 13	№ 21	№ 21	№ 29	№ 29	№ 37	№ 37
D	К3	К3	№ 6	№ 6	№ 14	№ 14	№ 22	№ 22	№ 30	№ 30	№ 38	№ 38
E	К4	К4	№ 7	№ 7	№ 15	№ 15	№ 23	№ 23	№ 31	№ 31	№ 39	№ 39
F	К5	К5	№ 8	№ 8	№ 16	№ 16	№ 24	№ 24	№ 32	№ 32	№ 40	№ 40
G	№ 1	№ 1	№ 9	№ 9	№ 17	№ 17	№ 25	№ 25	№ 33	№ 33	№ 41	№ 41
H	№ 2	№ 2	№ 10	№ 10	№ 18	№ 18	№ 26	№ 26	№ 34	№ 34	№ 42	№ 42

УДК 639.38:614.31:543.06:006.354 ОКС 67.120.30

Ключевые слова: рыба, нерыбные объекты, остаточное содержание, трифенилметановые красители, иммуноферментный метод анализа, малахитовый зеленый, лейкомалахитовый зеленый, кристаллический фиолетовый, бриллиантовый зеленый

Редактор *Н.Н. Мигунова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 23.08.2016. Подписано в печать 30.08.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10. Тираж 40 экз. Зак. 2047.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru