Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения

Методические указания
МУК 4.1.3535—18

Издание официальное

Москва • 2018

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения

Методические указания
МУК 4.1.3535—18

ББК 51.23
О62

О62 **Определение** остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—224 с.

ISBN 978–5–7508–1625–5

1. Методические указания разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (В. А. Тутельян, С. А. Хотимченко, С. А. Шевелева, Л. П. Минаева, Н. Р. Ефимочкина, В. В. Бессонов, А. Д. Малинкин, А. И. Алёшкина, М. А. Макаренко), ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора (Л. И. Иванова, А. Ю. Полторацкий) при участии А. В. Галкина.

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 23 марта 2018 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.23

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 23.04.18

Формат 60x90/16 Печ. л. 14,0

Тираж 130 экз. Заказ

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
ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2018

Содержание

I. Области применения 11
II. Методы исследования 12
Раздел I. Определение остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения 12
I.1. Определение остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа 12
I.1.А. Методика количественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения 12
I.1.А.1. Область применения количественного метода определения 12
I.1.А.2. Методика измерений при количественном методе определения 13
I.1.А.3. Метрологические характеристики количественного метода определения 13
I.1.А.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для количественного метода определения 15
I.1.А.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения 18
I.1.А.6. Подготовка к исследованию при количественном методе определения 18
I.1.А.7. Подготовка проб пищевых продуктов для количественного метода определения 20
I.1.А.8. Проведение исследований при количественном методе определения 28
I.1.А.9. Учёт и обработка результатов при количественном методе определения 29
I.1.А.10. Проверка приемлемости результатов параллельных определений при количественном методе определения 32
I.1.А.11. Оформление результатов определений при количественном методе определения 32
I.1.А.12. Контроль точности результатов измерения при количественном методе определения 33
I.1.Б. Методика полуколичественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения 33
I.1.Б.1. Область применения полуколичественного метода определения 33
I.1.Б.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения 34
I.1.Б.3. Пределы полуколичественного метода определения 35
I.1.Б.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения 36
I.1.Б.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения 36
I.1.Б.6. Подготовка к исследованию полуколичественным методом определения 36
I.1.Б.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения 36

I.1.Б.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения 40
I.1.Б.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения 40
I.1.Б.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения 41
I.1.Б.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения 41
I.1.Б.12. Подтверждение результата полуколичественного определения 41
Приложение I. Комплектация тест-системы для определения хлорамфеникола 42
I.2. Определение хлорамфеникола (левомицетина) методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС) 43
I.2.1. Назначение и область применения 43
I.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС 43
I.2.3. Критерии оценки результатов 44
I.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода 45
Раздел II. Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения 46
II.1. Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа 46
II.1.А. Методика количественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения 46
II.1.А.1. Область применения количественного метода определения 46
II.1.А.2. Методика измерений при количественном методе определения 47
II.1.А.3. Метрологические характеристики количественного метода определения 47
II.1.А.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для количественного метода определения 49
II.1.А.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения 52
II.1.А.6. Подготовка к исследованию при количественном методе определения 53
II.1.А.7. Подготовка проб пищевых продуктов для количественного метода определения 54
II.1.А.8. Проведение исследований при количественном методе определения 60
II.1.А.9. Учёт и обработка результатов при количественном методе определения 63
II.1.А.10. Проверка приемлемости результатов параллельных определений при количественном методе определения 65
II.1.А.11. Оформление результатов при количественном методе определения 65
II.1.А.12. Контроль точности результатов измерения при количественном методе определения 66

II.1.Б. Методика полуколичественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения 66
II.1.Б.1. Область применения полуколичественного метода определения 66
II.1.Б.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения 68
II.1.Б.3. Пределы полуколичественного метода определения 68
II.1.Б.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения 69
II.1.Б.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения 69
II.1.Б.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения 69
II.1.Б.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения 69
II.1.Б.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения 72
II.1.Б.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения 72
II.1.Б.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения 73
II.1.Б.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения 73
II.1.Б.12. Подтверждение результата полуколичественного определения 73
Приложение II. Комплектация тест-системы для определения антибиотиков тетрациклиновой группы 74
II.2. Определение антибиотиков тетрациклиновой группы методами подтверждающего анализа на основе ВЭЖХ-МС 76
II.2.1. Назначение и область применения 76
II.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС 76
II.2.3. Критерии оценки результатов 77
II.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода 78
Раздел III. Определение остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения 79
III.1. Определение остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа 79
III.1.А. Методика количественного определения остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения 79
III.1.А.1. Область применения количественного метода определения 79
III.1.А.2. Методика измерений при количественном методе определения 79
III.1.А.3. Метрологические характеристики количественного метода определения 80
III.1.А.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для количественного метода определения 81
III.1.А.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения 83
III.1.А.6. Подготовка к исследованию для количественного метода определения 84

III.1.А.7. Подготовка проб пищевых продуктов для количественного метода определения ... 85
III.1.А.8. Проведение исследований при количественном методе определения ... 87
III.1.А.9. Учёт и обработка результатов при количественном методе определения ... 88
III.1.А.10. Проверка приемлемости результатов параллельных определений при количественном методе определения ... 90
III.1.А.11. Оформление результатов при количественном методе определения ... 91
III.1.А.12. Контроль точности результатов измерения при количественном методе определения ... 91
III.1.Б. Методика полуколичественного определения остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения ... 91
III.1.Б.1. Область применения полуколичественного метода определения ... 91
III.1.Б.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения ... 92
III.1.Б.3. Пределы полуколичественного метода определения ... 92
III.1.Б.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения ... 93
III.1.Б.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения ... 94
III.1.Б.6. Подготовка к исследованию для полуколичественного метода определения ... 94
III.1.Б.7. Подготовка проб для полуколичественного метода определения ... 94
III.1.Б.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения ... 95
III.1.Б.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения ... 95
III.1.Б.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения ... 96
III.1.Б.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения ... 96
III.1.Б.12. Подтверждение результата полуколичественного определения ... 96
Приложение III. Комплектация тест-системы для определения бацитрацина ... 97
III.2. Определение бацитрацина методами подтверждающего анализа на основе ВЭЖХ-МС ... 98
III.2.1. Назначение и область применения ... 98
III.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС ... 98
III.2.3. Критерии оценки результатов ... 99
III.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода ... 100
Раздел IV. Определение остаточных количеств аминогликозидов (стрептомицин) в пищевой продукции животного происхождения ... 101
IV.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств аминогликозидов (стрептомицин) в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа ... 101
IV.1.1. Область применения полуколичественного метода определения ... 101
IV.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения ... 102
IV.1.3. Пределы полуколичественного метода определения ... 102

IV.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения ... 103
IV.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения ... 106
IV.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения ... 107
IV.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения ... 108
IV.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения ... 113
IV.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения ... 115
IV.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения ... 118
IV.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения ... 118
IV.1.12. Подтверждение результатов полуколичественного определения ... 118
Приложение IV. Комплектация тест-системы для определения стрептомицина ... 119
IV.2. Определение аминогликозидов (стрептомицин) методами подтверждающего анализа на основе ВЭЖХ-МС ... 120
IV.2.1. Назначение и область применения ... 120
IV.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС ... 120
IV.2.3. Критерии оценки результатов ... 122
IV.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода ... 122
Раздел V. Определение остаточных количеств пенициллинов в пищевой продукции животного происхождения ... 123
V.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств пенициллинов в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа ... 123
V.1.1. Область применения полуколичественного метода определения ... 123
V.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения ... 124
V.1.3. Пределы полуколичественного метода определения ... 124
V.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы при полуколичественном методе определения ... 125
V.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения ... 127
V.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения ... 128
V.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения ... 129
V.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения ... 134
V.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения ... 137
V.1.10. Расчет результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения ... 139

V.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения 139
V.1.12. Подтверждение результата полуколичественного метода определения 140
Приложение V. Комплектация тест-системы для определения пенициллинов 141
V.2. Определение пенициллинов методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС) 142
V.2.1. Назначение и область применения 142
V.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС 142
V.2.3. Критерии оценки результатов 143
V.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода ... 144
Раздел VI. Определения остаточных количеств хинолонов (фторхинолонов) в пищевой продукции животного происхождения 145
VI.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств хинолонов (фторхинолонов) в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа 145
VI.1.1. Область применения полуколичественного метода определения 145
VI.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения 145
VI.1.3. Пределы полуколичественного метода определения 146
VI.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения 146
VI.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения 149
VI.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения 150
VI.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения 151
VI.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения 155
VI.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения 157
VI.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения 159
VI.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения 159
VI.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения 159
Приложение VI. Комплектация тест-системы для определения хинолонов 160
VI.2. Определение хинолонов (фторхинолонов) методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.) 161
VI.2.1. Назначение и область применения 161
VI.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС 161
VI.2.3. Критерии оценки результатов 162
VI.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода .. 163
Раздел VII. Определение остаточных количеств сульфаниламидов в пищевой продукции животного происхождения 164
VII.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств сульфаниламидов в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа 164
VII.1.1. Область применения полуколичественного метода определения .. 164

VII.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения ... 164
VII.1.3. Пределы полуколичественного метода определения ... 165
VII.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения ... 165
VII.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения ... 168
VII.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения ... 169
VII.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения ... 171
VII.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения ... 175
VII.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения ... 177
VII.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения ... 180
VII.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения ... 180
VII.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения ... 180
Приложение VII. Комплектация тест-систем для определения сульфаниламидов ... 181
VII.2. Определение сульфаниламидов методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.) ... 183
VII.2.1. Назначение и область применения ... 183
VII.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС ... 183
VII.2.3. Критерии оценки результатов ... 184
VII.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода ... 185
Раздел VIII. Определение остаточных количеств нитроимидазолов в пищевой продукции животного происхождения ... 186
VIII.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств диметридазола в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа ... 186
VIII.1.1. Область применения полуколичественного метода определения ... 186
VIII.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения ... 186
VIII.1.3. Пределы полуколичественного метода определения ... 187
VIII.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения ... 187
VIII.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения ... 189
VIII.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения ... 190
VIII.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения ... 192
VIII.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения ... 193
VIII.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения ... 195

VIII.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе ... 198
VIII.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения ... 198
VIII.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения ... 198
Приложение VIII. Комплектация тест-системы для определения диметридазола ... 199
VIII.2. Определение нитроимидазолов методом подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.) ... 200
VIII.2.1. Назначение и область применения ... 200
VIII.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС ... 200
VIII.2.3. Критерии оценки результатов ... 201
VIII.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода ... 202
Раздел IX. Определение остаточных количеств метаболитов нитрофуранов в пищевой продукции животного происхождения ... 203
IX.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств метаболитов нитрофуранов АМОЗ и АОЗ в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа ... 203
IX.1.1. Область применения ... 203
IX.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения ... 203
IX.1.3. Пределы полуколичественного метода определения ... 204
IX.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения ... 205
IX.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном анализе ... 208
IX.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения ... 208
IX.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения ... 210
IX.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения ... 212
IX.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения ... 214
IX.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения ... 217
IX.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения ... 217
IX.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения ... 217
Приложение IX. Комплектация тест-систем для определения метаболитов нитрофурана ... 218
IX.2. Определение метаболитов нитрофуранов методом подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.) ... 220
IX.2.1. Назначение и область применения ... 220
IX.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС ... 220
IX.2.3. Критерии оценки результатов ... 221
IX.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода ... 222
Приложение для всех разделов. Пересчёт относительного центробежного ускорения в скорость центрифугирования ... 223

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
23 марта 2018 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения

Методические указания МУК 4.1.3535—18

I. Области применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения методики для определения остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов в продуктах животного происхождения.

1.2. Методические указания предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, для иных организаций и учреждений, осуществляющих контроль безопасности пищевой продукции, в том числе импортируемой в Российскую Федерацию, а также для аккредитованных на проведение соответствующих исследований организаций.

1.3. Методические указания носят рекомендательный характер.

1.4. Подготовка образцов пищевых продуктов животного происхождения путём приготовления экстрактов и вытяжек для определения в них остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов и алгоритм выбора метода при проведении исследований определяется в соответствии с методическими указаниями по подготовке проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов.

II. Методы исследования

Раздел I. Определение остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения

I.1. Определение остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

I.1.А. Методика количественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения

Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0042.24.04.18 от 24 апреля 2018 г.

I.1.А.1. Область применения количественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок количественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией (при 450 нм) (далее ИФА) для пищевых продуктов животного происхождения, в том числе для молока (сухого, цельного), молочных смесей для детского питания (восстановленных, жидких), молочных продуктов (творог, йогурт (без наполнителя/с фруктами), пахты и сыворотки, сливок, кефира, сметаны, сыра), масла сливочного; мяса скота и птицы; рыбы, креветок; яиц (сырых, замороженных); мёда.

Определение остаточных количеств хлорамфеникола количественным методом проводят для следующих групп продуктов животного происхождения:

1. Молоко и молочные продукты:

а) молоко, сливки (сырые, питьевые, сухие). Пределы определения хлорамфеникола (левомицетина) по стандартному веществу: молоко – 0,00003 мг/дм^3; сливки – 0,00001 мг/дм^3(кг);

б) продукты переработки молока: продукты кисломолочные (йогурт, кефир, сметана, творог), сыр, масло сливочное, пахта и сыворотка. Пределы определения хлорамфеникола (левомицетина) по стандартному веществу: молочные смеси для детского питания (восстановленные, жидкие) – 0,00003 мг/кг; йогурт (без наполнителя/с фруктовыми наполнителями), кефир, пахта и сыворотка – 0,000010 мг/кг; творог, сметана – 0,00003 мг/кг; масло сливочное – 0,00016 мг/кг; сыр – 0,00003 мг/кг.

2. Мясо скота и птицы. Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) по стандартному веществу: 0,00007 мг/кг.

3. Рыба и продукция аквакультуры:

а) рыба и креветки. Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) по стандартному веществу: 0,00007 мг/кг.

4. Яйца (сырые, замороженные). Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) по стандартному веществу: 0,00003 мг/кг.

5. Мёд. Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) по стандартному веществу – 0,00003 мг/кг.

I.1.А.2. Методика измерений при количественном методе определения

В основе принципа действия тест-системы лежит реакция «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты антителами к хлорамфениколу, которые связаны иммобилизированными антителами захвата. В лунки вносят растворы стандартов или проб и конъюгат хлорамфеникола. Свободный хлорамфеникол и 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 продукты реакции. Внесение стоп-раствора ведет к изменению окраски от синей к желтой. Измерения выполняют фотометрически при длине волны 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации хлорамфеникола в пробе.

I.1.А.3. Метрологические характеристики количественного метода определения

Метрологические характеристики метода определения остаточных количеств хлорамфеникола в пищевых продуктах животного происхождения, проводимого в соответствии с приведенной процедурой твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией, представлены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Метрологические характеристики количественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевых продуктах методом иммуноферментного анализа

Пищевые продукты	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, $P = 0{,}95$), $\pm\delta$, %	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

Продолжение табл. 1.1

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
Сливки	0,00001—0,00036	37	3,8	5,4	11	15	104
Сметана	0,00003—0,00082	42	5,3	7,5	15	21	92
Кефир	0,00001—0,00036	40	3,2	4,5	9	12	104
Йогурт	0,00001—0,00036	39	3,6	5,0	10	14	104
Йогурт с фруктовыми наполнителями	0,00001—0,00036	36	4,0	5,5	14	16	104
Творог	0,00003—0,00082	45	6,0	8,4	17	24	92
Пахта и сыворотка	0,00001—0,00036	37	4,0	5,6	11	16	104
Масло 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
Мёд	0,00003—0,00071	38	4,4	6,1	12	17	106
Яйца (сырые, замороженные)	0,00003—0,00090	51	3,6	5,0	10	14	98
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)							

I.1.А.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для количественного метода определения

I.1.А.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 $см^3$ и от 0,1 до 5 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ±1 %, с одноразовыми наконечниками	
Автоматические пипеточные дозаторы многоканальные с переменным объемом 0,03—0,3 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками	
Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г	
Фотометр вертикального типа – планшетный иммуноферментный анализатор с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и длиной волны 450 нм	
Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА	
pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01, не более	
Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 200, 250, 500 $см^3$	
Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2 вместимостью 50 и 100 $см^3$	
Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81)

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

I.1.А.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (50 ± 1) °С	
Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	

Измельчитель-гомогенизатор или фарфоровые ступки с пестиками	
Конические колбы на 50 и 100 $см^3$ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932—90
Магнитная мешалка	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 $см^3$	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 $см^3$	
Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 $см^3$	
Пробирки стеклянные объёмом не менее 15 $см^3$ с притертыми пробками	
Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[1] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/ RFS)[1] до 20 000 g	
Цилиндры 1(2,3)-100(250)-1	ГОСТ 1770
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин	
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин	
Шкаф (стол) лабораторный	

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

[1] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

I.1.А.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Калий железистосинеродистый 3-водный (желтая кровяная соль), чда	ГОСТ 4207—75
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), хч	ГОСТ 4172—76
Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$), хч	ГОСТ 245—76
Натрий хлористый (HCl), хч	ГОСТ 4233
Натрия гидроокись (NaOH), хч	ГОСТ 4328
Цинк сернокислый 7-водный ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), хч	ГОСТ 4174—77
Этилацетат, сорт высший	ГОСТ 8981—78
н-Гексан с содержанием основного вещества не менее 99,85 %, для ВЭЖХ	

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

I.1.А.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Набор для количественного определения левомицетина (хлорамфеникола) по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом (RIDASCREEN® *Chloramphenicol*, арт. R1511), включающий следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

2. Комплект стандартных растворов левомицетина со следующими концентрациями: 0, 25, 50, 100, 250, 750 нг/дм^3 в воде по 1,3 см^3 – 6 шт.

3. Конъюгат левомицетина с пероксидазой, готовый к употреблению, – 7,5 см^3.

4. Готовая смесь субстрата с хромогеном, содержащая пероксид карбамида и тетраметилбензидин, – 10 см^3.

5. Стоп-реагент, содержащий раствор 1 н серной кислоты, – 14 см^3.

6. Моющий буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина, – 1 пакет.

Набор рассчитан на проведение анализа в 2 повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

I.1.А.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-систем.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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 анализатора.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:
– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;
– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

I.1.А.6. Подготовка к исследованию при количественном методе определения

I.1.А.6.1. 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.

I.1.А.6.2. Подготовка оборудования

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

I.1.А.6.3. Хранение и использование тест-систем и реагентов

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

I.1.A.6.4. 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 2—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 (20—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 2—8 °С в течение 4—6 недель.

I.1.A.6.5. 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.

I.1.A.6.6. Приготовление осадителей (Каррезы)

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

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

I.1.A.6.7. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия

Навеску 20 г гидроокиси натрия, разводят в мерной колбе объемом 1 000 $см^3$ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

I.1.A.6.8. 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.

I.1.A.6.9. 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.

I.1.A.7. Подготовка проб пищевых продуктов для количественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

I.1.A.7.1. 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 документации на продукт) при отсутствии информации 1,0 г сухого продукта суспендируют в 9,0 $см^3$ дистиллированной воды. Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. I.1.A.6.7), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

Способ 1. 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 проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры не выше 4 °С).

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

Чтобы добиться наилучшей чувствительности, в качестве альтернативы может быть выполнена пробоподготовка (экстракция) согласно способам 2 и 3.

Способ 2 (экстракция). Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из жидкого исследуемого образца (жидкий молочный продукт, восстановленные и жидкие молочные смеси, в том числе смеси для питания детей) проводят следующим образом.

Вносят 10 $см^3$ образца в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, добавляют 1 $см^3$ осадителя 1 (Карез I) (п. I.1.А.6.6) и тщательно перемешивают на вортексе. Затем добавляют 1 $см^3$ осадителя 2 (Карез II) (п. I.1.А.6.6) и снова тщательно перемешивают на вортексе. Далее смесь центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре 4—12 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением предварительно охладить пробы до (8 ± 1) °С перед центрифугированием).

Супернатант 7,2 $см^3$ 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 (20—25 °С) в течение 10 минут при 3 000 g.

Этилацетатный супернатант 4 $см^3$ переносят в новую чистую 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 1*. После чего сухой остаток растворяют как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,4 $см^3$ 10 мМ моющего буфера (п. I.1.А.6.4) и тщательно перемешивают на вортексе.

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).

Примечание 1. 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.

Примечание 2. 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 про-

водят все процедуры экстракции, 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).

Способ 3 (экстракция). Экстракцию левомицетина (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 (Карез I) (п. I.1.А.6.6) и тщательно перемешивают на вортексе. Затем добавляют 0,5 $см^3$ осадителя 2 (Карез II) (п. I.1.А.6.6) и снова интенсивно перемешивают на вортексе. Далее смесь центрифугируют 10 мин при 3 000 g при температуре 4—12 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением предварительно охладить пробы до (8 ± 1) °С перед центрифугированием).

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 (20—25 °С) в течение 10 минут при 3 000 g.

Этилацетатный супернатант 4 $см^3$ переносят в новую чистую 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 1*. После чего сухой остаток растворяют как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,4 $см^3$ 10 мМ моющего буфера (п. I.1.А.6.4) и тщательно перемешивают на вортексе.

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).

I.1.А.7.2. Подготовка проб молочных продуктов

I.1.А.7.2.1. Йогурт (без наполнителя/с фруктами), кефир, пахта и сыворотка, сливки

Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. I.1.А.6.7), доводя значение pH до 7,0 ± 0,5. При исследовании продук-

та с фруктами отбрасывать частицы твердой консистенции, отбирать жидкую фракцию. Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из исследуемого образца проводят следующим образом.

Навеску 10,0 г пробы вносят в колбу вместимостью 100 $см^3$ с плотно закрывающейся пробкой, приливают 8,0 $см^3$ 20 мМ буфера (п. I.1.А.6.5) и перемешивают. Далее добавляют 1 $см^3$ осадителя 1 (Карез I) (п. I.1.А.6.6) и тщательно перемешивают на вортексе. После чего вносят 1 $см^3$ осадителя 2 (Карез II) (п. I.1.А.6.6) и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Готовую смесь переносят в центрифужные пробирки объёмом 15 $см^3$ и 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).

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 (20—25 °С).

Супернатант 4 $см^3$ переносят в новую 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 1*. После чего сухой остаток растворяют как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 1 $см^3$ моющего буфера (п. I.1.А.6.4).

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).

I.1.А.7.2.2. Творог, сметана

Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из исследуемого образца проводят следующим образом.

Навеску 5,0 г пробы вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$, прибавляют 15 $см^3$ 10%-го раствора метанола (п. I.1.А.6.8) 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 стеклянную 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 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 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 1.* После чего сухой остаток растворяют как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,5 $см^3$ моющего буфера (п. I.1.А.6.4).

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).

I.1.А.7.2.3. Масло сливочное

Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из исследуемого образца проводят следующим образом.

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. I.1.А.6.9) и повторно интенсивно перемешивают на вортексе в течение 10—15 с, затем перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (пе-

реверотом). 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 типа 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 (20—25 °С). Отбирают **нижнюю водную фазу** в пустую пробирку.

Нижнюю водную фазу разбавляют моющим буфером (п. I.1.А.6.4) 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.

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).

I.1.А.7.2.4. Сыр

Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из исследуемого образца проводят следующим образом.

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 (20—25 °С).

Супернатант 3,5 см^3 переносят в чистую 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 1*. После чего сухой остаток растворяют как описано ниже.

Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в 0,5 $см^3$ моющего буфера (п. I.1.А.6.4).

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).

I.1.А.7.3. Подготовка проб мяса скота и птицы, рыбы, креветок

Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из исследуемого образца проводят следующим образом.

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 чистую 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 $см^3$ моющего буфера (п. I.1.А.6.4) 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 моющим буфером (п. I.1.А.6.4) 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).

I.1.A.7.4. Подготовка проб яиц (сырые, замороженные)

Экстракцию левомицетина (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 (20—25 °С).

Супернатант 4 $см^3$ (соответствует 1 г пробы) переносят в чистую 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 $см^3$ моющего буфера (п. I.1.A.6.4) и тщательно перемешивают на вортексе 1 мин. Центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—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).

I.1.A.7.5. Подготовка проб мёда

Экстракцию левомицетина (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 (20—25 °С).

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

Сухой остаток растворяют в 0,5 $см^3$ моющего буфера (п. I.1.A.6.4) 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).

I.1.А.8. Проведение исследований при количественном методе определения

I.1.А.8.1. Общие положения

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.

2. 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.

I.1.А.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

I.1.А.8.3. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводят поэтапно:

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

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

3. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 $см^3$ конъюгата. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 1 часа в темном месте.

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

5. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер), приготовленным по п. I.1.А.6.4, 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.

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

6. 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 (20—25 °С) в течение 15 минут в темном месте.

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

8. 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.

I.1.А.9. Учёт и обработка результатов при количественном методе определения

I.1.А.9.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности содержимого лунок на планшетном фотометре (микропланшетном иммуноферментном анализаторе) при длине вол-

ны 450 нм. Оптическая плотность каждой лунки сравнивается с нулевым стандартом, значение которого принимается за 100 %.

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.

I.1.А.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа с помощью тест-систем RIDASCREEN® имеется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

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

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией антибиотика 0,00 нг/дм^3;

X – концентрация антибиотика в растворе, нг/дм^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \quad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы.

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

I.1.А.9.3. 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, полученных по 2 параллельным микролункам в результате двух параллельных определений.

Относительную оптическую плотность (A) вычисляют по формуле:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов левомицетина (хлорамфеникола) (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

I.1.А.9.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации левомицетина (хлорамфеникола) в нг/дм^3 строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

I.1.А.9.5. Концентрацию хлорамфеникола (x) в нг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

I.1.А.9.6. Массовую концентрацию (содержание) левомицетина (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 хлорамфеникола в экстракте испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, нг/дм^3;

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 1.2;

K – коэффициент пересчета нг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000 000.

Таблица 1.2

Факторы разбавления для расчета содержания левомицетина (хлорамфеникола) в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Молоко (цельное, обезжиренное) (прямое внесение), жидкие, восстановленные молочные смеси детского питания	1
Сухое молоко, молочные смеси (экстракция), в том числе для детского питания	1
Сухое молоко и сухие молочные смеси для детского питания с предварительным разбавлением (восстановлением)	1 × $K_в$ (коэффициент восстановления)
Молоко, жидкие молочные продукты без предварительного разбавления (экстракция)	1
Йогурт (с наполнителями и без), кефир, пахта и 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, мороженная, варено-мороженная)	2,5
Яйца (сырые, замороженные)	1
Мёд	1

I.1.А.10. Проверка приемлемости результатов параллельных определений при количественном методе определения

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости:

$$\frac{2\cdot|X_1 - X_2|\cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r \text{, где}$$

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

r – значение предела повторяемости (табл. 1.1), при этом $r = 2{,}8\sigma_r$.

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

I.1.А.11. Оформление результатов определений при количественном методе определения

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:

$$\Delta = \delta \frac{X}{100}, \text{ где}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1.1), %.

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«содержание левомицетина (хлорамфеникола) в молоке < 0,00003 мг/кг».

I.1.А.12. Контроль точности результатов измерения при количественном методе определения

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

I.1.Б. Методика полуколичественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевой продукции животного происхождения

I.1.Б.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) для следующих групп пищевых продуктов животного происхождения:

1. Молоко и молочные продукты

а) молоко, сливки (сгущённые, концентрированные), а также молокосодержащие. Пределы определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу), мг/кг: молоко сгущенное, концентрированное – 0,00003, сливки сгущенные – 0,00001;

б) продукты переработки молока: продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие, молочные напитки, а также молокосодержащие, в том числе для детского питания, молочные смеси (сухие, жидкие). Пределы определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу) мг/кг (мг/дм^3 – для жидких продуктов): молочные смеси (жидкие) – 0,00003; сухие молочные смеси (восстановление), сухие молочные смеси (экстракция) – 0,00003; продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие – 0,00001; продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога, в том числе молокосодержащие – 0,00003; молочные напитки на основе сыво-

ротки – 0,00001; молокосодержащие продукты сырные, сметанные продукты, продукты молокосодержащие сметанные – 0,00003;

в) молокосодержащие продукты (спреды сливочно-растительные). Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу) – 0,00016 мг/кг.

2. Мясо и мясопродукты, в том числе птичьи

а) субпродукты скота и птицы. Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу) – примерно 0,00007 мг/кг;

б) продукты из мяса и субпродуктов, в том числе птичьих, с содержанием мясных ингредиентов более 50 % (колбасные изделия, консервы мясные, в том числе для детского питания). Пределы определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу): колбасные изделия, консервы мясные – 0,00007 мг/кг.

3. Рыба и рыбная продукция, продукция аквакультуры

Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %). Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу) – 0,00015 мг/кг.

4. Яйцепродукты

Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок). Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу) – 0,00030 мг/кг (в сухом продукте).

5. Масложировая продукция (спреды растительно-сливочные). Предел определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу) – 0,00016 мг/кг.

6. Маточное молочко пчёл. Предел обнаружения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу) – 0,00002 мг/кг.

7. Биологически активные добавки к пище на основе переработки животного сырья, не включающие в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (солей йода, лизоцим и т. п.) (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %). Пределы определения хлорамфеникола (левомицетина) (по стандартному веществу), мг/кг:

а) БАД к пище на молочной основе (сухие) – 0,00027 (в пересчете на сухой продукт);

б) БАД к пище на основе мясного, рыбного сырья и аквакультуры – 0,00035 (в пересчете на сухой продукт).

I.1.Б.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

Тот же, что и для количественного метода определения (п. I.1.А.2).

I.1.Б.3. Пределы полуколичественного метода определения

Таблица 1.3

Пределы определения остаточных количеств хлорамфеникола (левомицетина) в пищевых продуктах полуколичественным методом иммуноферментного анализа

Пищевые продукты	Пределы определения, мг/кг (мг/дм^3)
1	2
Молоко (сгущённое, концентрированное)	0,00003
Сливки (сгущённые, концентрированные)	0,00001
Молочные смеси (сухие) с предварительным разбавлением (восстановлением)	0,00027
Молочные смеси без предварительного разбавления (жидкие) (прямое внесение)	0,00003
Молочные смеси сухие (экстракция)	0,00003
БАД к пище на молочной основе (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) с предварительным разбавлением (восстановлением) (в сухом продукте)	0,00027
Продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие	0,00001
Продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога	0,00003
Продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) молокосодержащие	0,00003
Молочные напитки на основе сыворотки	0,00001
Сметанные продукты, продукты молокосодержащие сметанные	0,00003
Молокосодержащие продукты сырные	0,00003
Спреды (все виды)	0,00016
Субпродукты скота и птицы	0,00007
Продукты из мяса и субпродуктов: колбасные изделия, консервы мясные (с содержанием мясных ингредиентов более 50 %)	0,00007
БАД к пище на основе мясного, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %) (в сухом продукте)	0,00035
Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)	0,00015
Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок)	0,00030
Маточное молочко	0,00002

I.1.Б.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

II.1.Б.4.1. Средства измерений

Те же, что и для количественного метода определения по п. I.1.А.4.1.

II.1.Б.4.2. Вспомогательные устройства, посуда, материалы

Те же, что и для количественного метода определения по п. I.1.А.4.2.

II.1.Б.4.3. Реактивы

Те же, что и для количественного метода определения по п. I.1.А.4.3.

I.1.Б.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением I (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

I.1.Б.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения

Те же, что и для количественного метода определения (п. I.1.А.5).

I.1.Б.6. Подготовка к исследованию полуколичественным методом определения

Та же, что и для количественного метода определения (п. I.1.А.6).

I.1.Б.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

I.1.Б.7.1. Подготовка проб молока (сгущённого, концентрированного), молочных смесей (сухих, жидких, восстановленных)

I.1.Б.7.1.1. Подготовка проб молока (сгущённого, концентрированного)

Образцы продуктов в концентрированном виде предварительно восстанавливают в воде: 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды. Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. I.1.А.6.7), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

Далее пробоподготовка по п. I.1.А.7.1, как для жидкого продукта (способ 1 и 2).

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления: 1 – для жидких и восстановленных продуктов (содержание хлорамфеникола в восстановленном продукте), 10 – для сгущенных, концентрированных и сухих продуктов (содержание хлорамфеникола в исходном продукте).

I.1.Б.7.1.2. Подготовка проб молочных смесей (сухих, жидких, восстановленных)

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде: 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды или восстанавливают в соответствии с инструкцией изготовителя.

Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. I.1.А.6.7), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

Далее пробоподготовка по п. I.1.А.7.1 для жидких и восстановленных продуктов (Способ 2) или для сухих продуктов (Способ 3).

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления: 1 – для жидких и восстановленных продуктов (содержание хлорамфеникола в восстановленном продукте), 10 – для сухих продуктов (содержание хлорамфеникола в исходном сухом продукте), при восстановлении в соответствии с инструкцией учитывают фактор восстановления ($К_в$).

I.1.Б.7.2. Подготовка проб молочных продуктов

I.1.Б.7.2.1. Продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие, молочные напитки на основе сыворотки, сливки (сгущённые, концентрированные)

Пробоподготовку неконцентрированных продуктов проводят по п. I.1.А.7.2.1.

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 0,5.

Образцы продуктов в концентрированном виде предварительно восстанавливают в воде: 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды. Далее пробоподготовку проводят по п. I.1.А.7.2.1.

При расчете конечного результата для сгущенных и концентрированных продуктов учитывают фактор разбавления – 5.

I.1.Б.7.2.2. Продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога и молокосодержащие; сметанные продукты и продукты сметанные молокосодержащие

Пробоподготовку проводят по п. I.1.А.7.2.2.

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

I.1.Б.7.2.3. Спреды молочно-сливочные

Пробоподготовку проводят по п. I.1.А.7.2.3.

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 5,2.

I.1.Б.7.2.4. Молокосодержащие продукты сырные

Пробоподготовку проводят по п. I.1.А.7.2.4.

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

I.1.Б.7.3. Подготовка проб субпродуктов скота и птицы, продуктов из мяса и субпродуктов: колбасные изделия, консервы мясные (с содержанием мясных ингредиентов более 50 %), переработанной продукции из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)

Пробоподготовку проводят по п. I.1.А.7.3.

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 2,5.

I.1.Б.7.4. Подготовка проб яичных продуктов сухих (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок)

Исследуемые образцы сухих яичных продуктов предварительно гомогенизируют в дистиллированной воде в соотношении 1 : 10 (1,0 г образца и 9,0 см^3 дистиллированной воды). Далее пробоподготовку проводят по п. I.1.А.7.4.

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10 (содержание хлорамфеникола в сухом продукте).

I.1.Б.7.5. Подготовка проб маточного молочка

Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из исследуемого образца проводят следующим образом.

Навеску 2 г маточного молочка вносят в центрифужную пробирку, прибавляют 3 см^3 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. I.1.А.6.7), встряхивают до полного растворения маточного молочка, после чего приливают 8 см^3 этилацетата и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 1 мин и продолжают экстракцию 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 2 см^3 переносят в чистую пробирку и испаряют досуха при 60 °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Сухой остаток растворяют в 0,5 $см^3$ моющего буфера (п. I.1.А.6.4) и тщательно перемешивают на вортексе.

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

Примечание. В случае необходимости при анализе содержания левомицетина (хлорамфеникола) в пределах 0,01 мг/кг для получения результатов содержания антибиотика в границах диапазона определяемого содержания вводят дополнительное разведение подготовленного экстракта пробы в 30 раз.

I.1.Б.7.6. Подготовка проб биологически активных добавок к пище на основе переработки мясо-молочного сырья, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %)

Методика описывает пробоподготовку для БАД к пище на основе животного сырья, не включающих в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (солей йода, лизоцим и т. п.).

Экстракцию левомицетина (хлорамфеникола) из исследуемых образцов БАД проводят следующим образом.

Всё количество представительной пробы БАД в форме таблеток, капсул, порошка, сухих форм (например, чипсы) полностью измельчают в гомогенизаторе или в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. БАД в виде сухого порошка тщательного перемешивают в блендере.

Далее готовят 10 %-ю суспензию гомогенизированной пробы. Для этого 1 г навески сухого продукта разводят в 9 $см^3$ дистиллированной воды, вновь тщательно перемешивают, встряхивают до полного растворения/суспендирования на вортексе в течение 1 мин и потом перемешивают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Далее экстракцию подготовленной таким образом пробы, проводят:

– для БАД на основе переработки молочного сырья – по п. I.1.А.7.1, способ 1 (дополнительно учитывают коэффициент разведения 10);

– для БАД на основе переработки мясного, рыбного сырья и аквакультуры (кроме рыбьего жира), следующим образом: 6 г приготовленной суспензии вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, прибавляют 6 $см^3$ этилацетата и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

После чего суспензию центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). Отбирают 4 $см^3$ супернатанта в чистую 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 моющего буфера (п. I.1.А.6.4) и тщательно перемешивают на вортексе. Центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). В чистую пробирку отбирают **нижнюю водную фазу.**

Нижнюю водную фазу разбавляют моющим буфером (п. I.1.А.6.4) в соотношении 1 : 9 (например: 0,05 см^3 нижней фазы + 0,45 см^3 моющего буфера).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 12,5.

I.1.Б.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

То же, что и для количественного метода определения (п. I.1.А.8) .

I.1.Б.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

Тот же, что и для количественного метода определения (п. I.1.А.9).

Факторы разбавления для расчета содержания левомицетина (хлорамфеникола) в различных пробах при полуколичественном методе определения в соответствии с табл. 1.4.

Таблица 1.4

Факторы разбавления для расчета содержания левомицетина (хлорамфеникола) в различных пробах при полуколичественном методе определения

Пищевые продукты	Фактор разбавления
1	2
Молоко (сгущённое, концентрированное)	10,0
Сливки (сгущённые, концентрированные)	5,0
Молочные смеси (сухие) с предварительным разбавлением (восстановлением)	1 × $K_в$ (коэффициент восстановления)
БАД к пище на молочной основе (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) (в пересчете на сухой продукт)	10,0
Молочные смеси без предварительного разбавления (жидкие) (прямое внесение)	1,0
Молочные смеси сухие (экстракция)	1,0
Продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие	0,5
Продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога и молокосодержащие	1,0
Сметанные продукты и продукты сметанные молокосодержащие	1,0
Молочные напитки на основе сыворотки	0,5
Молокосодержащие продукты сырные	1,0

Продолжение табл. 1.4

1	2
Спреды (все виды)	5,2
Субпродукты скота и птицы	2,5
Продукты из мяса и субпродуктов: колбасные изделия, консервы мясные (с содержанием мясных ингредиентов более 50 %)	2,5
БАД к пище на основе переработки мясо-молочного, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %) (в пересчете на сухой продукт)	12,5
Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)	2,5
Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок)	10,0
Маточное молочко	1,0

I.1.Б.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

I.1.Б.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если содержание компонента выше предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 1.3), то результат анализа представляют в виде:

«*хлорамфеникол (левомицетин) в молоке обнаружен*».

Если содержание компонента ниже предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 1.3), то результат анализа представляют в виде:

«*хлорамфеникол (левомицетин) в молоке не обнаружен*».

I.1.Б.12. Подтверждение результата полуколичественного определения

При исследовании полуколичественным методом необходимо подтверждение полученного результата в случае обнаружения хлорамфеникола (левомицетина) на уровне и выше МДУ с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение I
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы для определения хлорамфеникола
(на примере RIDASCREEN® Chloramphenicol, арт. R1511)[2]

Тест-система для количественного определения хлорамфеникола (левомицетина) по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

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.

3. Конъюгат левомицетина с пероксидазой, готовый к употреблению – 7,5 см^3.

4. Готовая смесь субстрата с хромогеном, содержащая пероксид карбамида и тетраметилбензидин – 10 см^3.

5. Стоп-реагент, содержащий раствор 1 н серной кислоты – 14 см^3.

6. Моющий буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина – 1 пакет.

Набор рассчитан на проведение анализа в 2 повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

Специфичность методики определения хлорамфеникола, установленная по перекрестной чувствительности к исследованным антибиотикам в буферной системе (на примере RIDASCREEN® *Chloramphenicol*, арт. R1511), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
Хлорамфеникол (левомицетин) (PR-пара-стереоизомер) (вещество калибровочного стандарта)	100
Декстрамицин (SS-пара-стереоизомер)	< 1
Все другие стереоизомеры	не определялась
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	примерно 68

Специфичность к антибиотикам для других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

[2] Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

I.2. Определение хлорамфеникола (левомицетина) методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС)

I.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания хлорамфеникола проводится в молоке и молочных продуктах, яйцах и яичных продуктах, мясе, мясных продуктах и продуктах из мяса птицы, мёде, рыбе и морепродуктах и в продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 0,2—1 000 мкг/кг.

I.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотика на уровнях, близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотика, обнаруженного методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержания антибиотика в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчет берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотика в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода определения равно

или выше МДУ – необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотика проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотика проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотика в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствует антибиотик, определенный методом ИФА, дополнительного количества антибиотика. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времени удерживания пиков антибиотика пробы и антибиотика добавленного, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Отмечаем, что проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия левомицетина в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

I.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотика в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженное вещество в составе образца совпадает как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со сравнительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандарта антибиотика;

б) соотношение сигнал/шум полученного пика определяемого антибиотика в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотика в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае невыполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

I.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2011.09610.

– Свидетельство № 01.00225/205-8-11 от 10.02.2011.

Раздел II. Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения

II.1. Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

II.1.А. Методика количественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения

Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0040.24.04.18 от 24 апреля 2018 г.

II.1.А.1. Область применения количественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок количественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией (при 450 нм) (далее – ИФА) для пищевых продуктов животного происхождения, в том числе для молока и сливок (сырых, питьевых, сухих), молочных смесей для детского питания (сухих, восстановленных, жидких), кисломолочных продуктов (сметана, творог, йогурт (без наполнителя/с фруктовыми наполнителями, кефир), сыра, масла сливочного; мяса скота и птицы; мясо- и птицепродуктов (колбасные изделия, консервы мясные для детского питания); рыбы, креветок; яиц (сырых, замороженных); мёда.

Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы количественным методом проводят для следующих групп продуктов животного происхождения:

1. Молоко и молочные продукты

а) молоко, сливки (сырые, питьевые, сухие). Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу): молоко и сливки – 0,001 мг/кг;

б) продукты переработки молока: кисломолочные продукты (сметана, творог, йогурт (без наполнителя/с фруктовыми наполнителями, кефир, сметана) сыр, масло сливочное. Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу): кисломолочные продукты (творог, йогурт (без наполнителя/с фруктовыми наполнителями), кефир, сметана – 0,001 мг/кг; масло сливочное – 0,003 мг/кг; сыр – 0,002 мг/кг; молочные смеси для детского питания (сухие, восстановленные, жидкие) – 0,005 мг/кг.

2. Мясо скота и птицы, мясо- и птицепродукты, в том числе птицы

а) мясо скота и птицы. Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) – 0,002 мг/кг;

б) мясо- и птицепродукты (колбасные изделия, консервы мясные для детского питания). Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) (колбасные изделия, консервы мясные для детского питания) – 0,005 мг/кг.

3. Рыба, продукция аквакультуры

а) рыба, креветки. Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу): рыба сырая – 0,002 мг/кг, креветки – 0,001 мг/кг.

4. Яйца и яйцепродукты

а) яйца (сырые, замороженные). Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) – 0,004 мг/кг.

5. Мёд

Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) – 0,004 мг/кг.

II.1.А.2. Методика измерений при количественном методе определения

В основе принципа действия тест-системы лежит реакция «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты конъюгатом тетрациклина с белком. Вносят стандартные растворы тетрациклина или растворы проб, а потом добавляют антитела к тетрациклину. Свободный тетрациклин и иммобилизированный 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 проводят выдержку. 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.

II.1.А.3. Метрологические характеристики количественного метода определения

Метрологические характеристики метода определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевых продуктах, проводимого в полном соответствии с приведенной процедурой твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа, представлены в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Метрологические характеристики количественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевых продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа

Пищевые продукты	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, P=0,95), ± δ, %	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	11,0	22	31	111
Молочные смеси для детского питания (сухие, восстановленные, жидкие)	0,005—0,184	33	4,0	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 с фруктовыми наполнителями	0,001—0,018	34	7,0	9,8	20	27	98
Йогурт (без наполнителя)	0,001—0,020	28	4,6	6,4	13	18	103
Сметана	0,001—0,017	38	7,0	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 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

Продолжение табл. 2.1

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

II.1.А.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для количественного метода определения

II.1.А.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с переменным объемом от 0,02 до 0,2 $см^3$ и от 0,1 до 1 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы 8-канальные с переменным объемом от 0,05 до 0,3 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г

Фотометр вертикального типа фотометрирования (микропланшетный иммуноферментный анализатор) с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и светофильтром на 450 нм

Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА

pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01

Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1 000 $см^3$	
Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 $см^3$	
Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2 вместимостью 50 и 100 $см^3$	
Пипетки (с делениями) 2-го класса точности объемом 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1-81)

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

II.1.А.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (60 ± 1) °С	
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов, или фарфоровые ступки с пестиками)	
Конические колбы на 50 и 100 $см^3$ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932—90
Магнитная мешалка	
Микрошпатель	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 $см^3$ однократного применения	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 $см^3$	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 $см^3$	
Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 $см^3$	
Пробирки стеклянные объёмом не менее 15 $см^3$ с притертыми пробками	
Ступка фарфоровая с пестом	
Стеклянный флакон с винтовой крышкой вместимостью не менее 80 $см^3$	
Стеклянные палочки	

Устройство для испарения экстрактов или центрифужный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[3] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	
Центрифуга настольная с относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[3] до 20 000 g	
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин	
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин	
Шкаф (стол) лабораторный	
Ультразвуковая ванна с эффективной мощностью ультразвука 60 Вт (дополнительно, для сухого молока и проб меда)	

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

II.1.А.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Натрия гидроокись (NaOH), хч	ГОСТ 4328
Натрий хлористый (HCl), хч	ГОСТ 4233
Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$), хч	ГОСТ 4172—76
Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$), хч	ГОСТ 245—76
Янтарная кислота, хч	
н-Гексан с содержанием основного вещества не менее 99,85 %, для ВЭЖХ	

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

[3] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

II.1.А.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Набор для количественного определения антибиотиков тетрациклиновой группы по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом (RIDASCREEN® Tetracyclin, арт. R3505), включающий следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

2. Комплект стандартных концентрированных растворов тетрациклина 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.

3. Конъюгат – 10 см^3.

4. Антитела – 6 см^3.

5. Готовая смесь субстрата с хромогеном, содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин – 10 см^3.

6. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 14 см^3.

7. 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.

8. 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.

9. PBS-буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина – 1 пакет.

Набор рассчитан на проведение анализа в 2 повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

II.1.А.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-наборов.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;

– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

II.1.А.6. Подготовка к исследованию при количественном методе определения

II.1.А.6.1. 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.

II.1.А.6.2. Подготовка оборудования

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

II.1.А.6.3. Хранение и использование наборов и реагентов

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

II.1.А.6.4. Приготовление 10 мМ моющего буферного раствора с pH 7,4 (PBS-буфер)

Способ 1. Используют пакет с солью для приготовления моющего буфера, входящий в комплект набора. Растворяют содержимое целого пакетика в 1 $дм^3$ дистиллированной воды. Готовый 10 мМ моющий буфер может храниться при температуре 2—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 (20—25 °С).

Для приготовления готового к употреблению 10 мМ моющего буфера растворяют одну часть 10-кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

II.1.А.6.5. Приготовление 1 н раствора гидроокиси натрия

Для приготовления 1 н раствора гидроокиси натрия навеску 40 г гидроокиси натрия разводят в мерной колбе объемом 1 000 $см^3$ дистиллированной водой до метки.

II.1.А.6.6. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия

Навеску 20 г гидроокиси натрия разводят в мерной колбе объемом 1 000 $см^3$ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

II.1.А.6.7. 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.

II.1.А.6.8. Приготовление 20%-го раствора 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.

II.1.А.6.9. Приготовление 50 мМ буферного раствора янтарной кислоты

Навеску 5,9 г янтарной кислоты растворяют в 500 $см^3$ дистиллированной воды, устанавливают pH до 4,0 с помощью 1 н NaOH, доводят до 1 000 $см^3$ дистиллированной водой.

II.1.А.6.10. 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.

II.1.А.7. Подготовка проб пищевых продуктов для количественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

II.1.А.7.1. Подготовка проб молока (сырое, питьевое, сухое), молочных смесей для детского питания (сухие, восстановленные, жидкие)

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документации на продукт), при отсутствии информации 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды. Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. II.1.А.6.6), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

II.1.А.7.1.1. 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 $см^3$ молока +0,45 $см^3$ буфера 2 для проб).

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

II.1.А.7.1.2. Молоко и молочные смеси с содержанием жира > 1,5 % (жидкие, восстановленные)

Образец молока или молочного продукта с содержанием жира > 1,5 % отбирают по 5—10 $см^3$в центрифужную пробирку объёмом 15 $см^3$, центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре 4—8 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 4—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 $см^3$ молока + 0,45 $см^3$ буфера 2 для проб).

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

II.1.A.7.1.3. 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 °С, 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 g и температуре 4—8 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 4—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 см^3 молока + 0,45 см^3 буфера 2 для проб).

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

II.1.A.7.2. Подготовка проб молочных продуктов

II.1.A.7.2.1. Кисломолочные продукты (творог, йогурт (без наполнителя/с фруктовыми наполнителями), кефир, сливки, сметана

Навеску 5 г исследуемого продукта вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3, инкубируют 15 минут при температуре 50 °С, например, на водяной бане, перемешивают на вортексе, пока проба не гомогенизируется полностью.

Далее центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре 4—8 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 4—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 см^3 молока + 0,45 см^3 буфера 2 для проб).

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

II.1.А.7.2.2. Сливочное масло

Навеску 1 г исследуемого продукта вносят в центрифужную пробирку объёмом 15 см^3, расплавляют на водяной бане при температуре около 40 °С.

В пробирку с расплавленной пробой вносят 1 см^3 н-гексана и интенсивно перемешивают 1 мин на вортексе, после чего добавляют 1 см^3 20%-го раствора метанола (п. II.1.А.6.8), 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 см^3 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 см^3 переносят в пробирку на 1,5—2 см^3 и помещают на лед на 10 минут. После чего центрифугируют 10 мин при 20 000 g при комнатной температуре (20—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 см^3 пробы + 0,8 см^3 буфера 1 для проб) в чистой стеклянной пробирке.

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

Примечание. При проведении прообоподготовки с использованием н-гексана для исключения ложноположительных результатов необходимо использовать *отрицательный контроль*. При подготовке *отрицательного контроля* вместо пробы вносят соответствующий объем дистиллированной воды и проводят все процедуры экстракции 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).

II.1.А.7.2.3. 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 $см^3$ метанола 10 %-го (п. II.1.А.6.8) и гомогенизируют в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Гомогенизированную пробу переносят в центрифужную пробирку на 50 $см^3$ и встряхивают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Далее гомогенизированную пробу центрифугируют 15 мин при 3 000 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). Водную (среднюю) фазу в количестве 1 $см^3$ переносят в пробирку на 1,5—2 $см^3$.

Далее пробу центрифугируют 5 мин при 20 000 g при комнатной температуре (20—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 $см^3$ супернатанта + 0,4 $см^3$ буфера 2 для разбавления проб) в чистой стеклянной пробирке.

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

II.1.А.7.3. Подготовка проб мяса скота и птицы

II.1.А.7.3.1. 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 pH 7,4 (п. II.1.А.6.10), 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 (20—25 °С), отбирают 1 $см^3$ супернатанта и переносят его в чистую пробирку.

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

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

II.1.А.7.3.2. 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 pH 7,4 (п. II.1.А.6.10) и гомогенизируют в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Гомогенизированную пробу равномерно распределяют в центрифужных пробирках объёмом 15 см^3 и центрифугируют 10 мин при 4 000 g и температуре 4—8 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 4—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 см^3 супернатанта + 0,5 см^3 буфера 1 для проб) в чистой стеклянной пробирке.

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

II.1.А.7.4. Подготовка проб рыбы, креветок

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 см^3 с винтовой крышкой и приливают 9 см^3 20 мМ **PBS-буфера** с pH 7,4 (п. II.1.А.6.10), 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 g и комнатной температуре (20—25 °С), супернатант отбирают в пустую пробирку.

Для анализа используют 0,05 см^3 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 см^3 супернатанта добавляют 2 см^3 н-гексана и перемешивают на вортексе не менее 10 с. Далее центрифугируют 10 мин при 4 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). **Нижнюю водную фазу** отбирают в пустую пробирку.

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

II.1.A.7.5. Подготовка проб яиц (сырые, замороженные)

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

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 4 г переносят в центрифужную пробирку объёмом 50 $см^3$ и приливают 20 $см^3$ 50 мМ буферного раствора янтарной кислоты (п. II.1.A.6.9). Для экстракции перемешивают пробу встряхиванием 15 мин при комнатной температуре (20—25 °С).

Центрифугируют 15 мин при 4 000 g при комнатной температуре (20—25 °С), супернатант отбирают в пустую пробирку.

Супернатант разбавляют в соотношении 1 : 10 (1 + 9) 20 мМ **PBS-буфером** с pH 7,4 (п. II.1.A.6.10) (например, 0,1 $см^3$ супернатанта + 0,9 $см^3$ 20 мМ PBS-буфера) в чистой стеклянной пробирке.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 60.

II.1.A.7.6. Подготовка проб мёда

Навеску меда 1 г отбирают в стеклянный флакон с винтовой крышкой (вместимостью не менее 80 $см^3$), разбавляют в соотношении 1 : 50 (1 + 49) 20 мМ **PBS-буфером**, pH 7,4 (п. II.1.A.6.10) (например, 1 г мёда + 50 $см^3$ 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 пред анализом пробирки с пробами необходимо встряхнуть несколько раз вверх–вниз.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 50.

II.1.A.8. Проведение исследований при количественном методе определения

II.1.A.8.1. Общие положения

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.

2. Не допускается заменять реагенты в составе одного комплекта реагентами из другого комплекта с другим номером партии. Не допуска-

ется перекрестное использование реагентов из комплектов с разными номерами партий.

II.1.А.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

II.1.А.8.3. Алгоритм проведения исследования

II.1.А.8.3.1. 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 $см^3$ концентрированного стандарта + 0,45 $см^3$ буфера) и тщательно перемешать. Использовать **стеклянные пробирки**.

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

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

II.1.А.8.3.2. Анализ проводят поэтапно:

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

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

3. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 $см^3$ раствора антител к тетрациклину. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 1 часа в темном месте.

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

5. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер по п. II.1.А.6.10), 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.

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

6. После отмывания добавляют по 0,1 $см^3$ смеси ферментного конъюгата в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 15 мин в темном месте.

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

8. Повторяют процедуру отмывки – заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер по п. II.1.А.6.10), 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.

9. 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 (20—25 °С) в течение 15 мин в темном месте.

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.

II.1.А.9. Учёт и обработка результатов при количественном методе определения

II.1.А.9.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на фотометре планшетном (микропланшетном иммуноферментном анализаторе) 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 ($А_{450нм} < 0,8$) 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.

II.1.А.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа используется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \text{ где} \qquad (1)$$

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

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

C – концентрация антибиотика в растворе, мкг/дм^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \qquad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы.

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

II.1.А.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов тетрациклинов (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

II.1.А.9.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим им значениям концентрации антибиотика, строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

II.1.А.9.5. Концентрацию тетрациклина (x) в мкг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

II.1.А.9.6. Массовую концентрацию (содержание) тетрациклина в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 2.2;

K – коэффициент пересчета мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000.

Таблица 2.2

Факторы разбавления для расчета содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Молоко (жидкое)	10
Сухое молоко с предварительным разбавлением (восстановлением)	100
Йогурт (с наполнителями и без), кефир, сливки	10
Творог, сметана	10
Масло 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

II.1.A.10. Проверка приемлемости результатов параллельных определений при количественном методе определения

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости:

$$\frac{2\cdot|X_1 - X_2|\cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r, \text{ где}$$

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

r – значение предела повторяемости (табл. 2.1), при этом $r = 2{,}8\sigma_r$.

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

II.1.A.11. Оформление результатов при количественном методе определения

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:

$$\Delta = \delta \frac{X}{100}, \text{ где}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 2.1), %.

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«*содержание антибиотиков тетрациклиновой группы в молоке* < *0,0009 мг/дм*^{3}».

II.1.А.12. Контроль точности результатов измерения при количественном методе определения

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

II.1.Б. Методика полуколичественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции животного происхождения

II.1.Б.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) для следующих групп пищевых продуктов животного происхождения:

1. Молоко и молочные продукты

а) молоко, сливки (сгущённые, концентрированные), а также молокосодержащие. Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу), мг/кг: молоко (сгущенное, концентрированное) – 0,0045, сливки (сгущенные, концентрированные) – 0,0045;

б) продукты переработки молока: продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие, молочные напитки, а также молокосодержащие, в том числе для детского питания, молочные смеси (сухие, жидкие). Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) мг/кг (мг/дм^3 – для жидких продуктов): молочные напитки на основе сыворотки – 0,001; молочные смеси (жидкие, восстановленные) – 0,005; сухие

молочные смеси (в пересчете на сухой продукт) – 0,005; продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие – 0,001; продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога, в том числе молокосодержащие – 0,001; молочные напитки на основе сыворотки – 0,001; молокосодержащие продукты сырные, сметанные продукты – 0,001; продукты молокосодержащие сметанные – 0,002;

в) молокосодержащие продукты (спреды сливочно-растительные). Предел определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) – 0,003 мг/кг.

2. Мясопродукты, в том числе из птицы

а) субпродукты скота и птицы. Предел обнаружения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) – примерно 0,0015 мг/кг;

б) продукты из субпродуктов, в том числе птичьих с содержанием мясных ингредиентов более 50 % (колбасные изделия, консервы, в том числе для детского питания). Предел обнаружения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) (колбасные изделия, консервы) – примерно 0,005 мг/кг.

3. Рыбная продукция, продукция аквакультуры

Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)). Предел обнаружения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу): консервы рыбные – 0,0015 мг/кг.

4. Яйцепродукты

Яичные продукты (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок). Предел обнаружения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу): яичный порошок, меланж, сухой яичный белок (в пересчете на сухой продукт) – 0,040 мг/кг.

5. Масло-жировая продукция (спреды растительно-сливочные)

Предел обнаружения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу) – примерно 0,003 мг/кг.

6. Биологически активные добавки к пище на основе переработки животного сырья, не включающие в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (соли йода, лизоцим и т. п.) (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %). Пределы определения антибиотиков тетрациклиновой группы (по стандартному веществу), мг/кг:

а) БАД к пище на молочной основе (сухие) – 0,005 (в пересчете на сухой продукт);

б) БАД к пище на основе мясного, рыбного сырья и аквакультуры – 0,0025 (в пересчете на сухой продукт).

II.1.Б.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

Та же, что и для количественного метода определения (п. II.1.А.2).

II.1.Б.3. Пределы полуколичественного метода определения

Таблица 2.3

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы методом иммуноферментного анализа

Пищевые продукты	Пределы определения, мг/кг (мг/дм^3)
Молоко (сгущённое, концентрированное)	0,0045
Сливки (сгущённые, концентрированные)	0,0045
Молочные смеси (восстановленные жидкие) (при коэффициенте восстановления – 10)	0,005
Молочные смеси (сухие) (в сухом продукте) (при коэффициенте разведении – 5)	0,005
БАД к пище на молочной основе (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) (сухие) (при коэффициенте разведении – 5)	0,005
Продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие	0,001
Продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога и молокосодержащие	0,001
Сметанные продукты и продукты сметанные молокосодержащие	0,001
Молочные напитки на основе сыворотки	0,001
Молокосодержащие продукты сырные	0,002
Спреды (все виды)	0,003
Субпродукты скота и птицы	0,0015
Продукты из мяса и субпродуктов: колбасные изделия, консервы мясные (с содержанием мясных ингредиентов более 50 %)	0,005
БАД к пище на основе переработки мясного, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %) (в сухом продукте)	0,0025
Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)	0,0015
Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок) (в сухом продукте)	0,040

II.1.Б.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

II.1.Б.4.1. Средства измерений

Те же, что и для количественного метода определения по п. II.1.А.4.1.

II.1.Б.4.2. Вспомогательные устройства, посуда, материалы

Те же, что и для количественного метода определения по п. II.1.А.4.2.

II.1.Б.4.3. Реактивы

Те же, что и для количественного метода определения по п. II.1.А.4.3.

II.1.Б.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением II (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

II.1.Б.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения

Те же, что и при количественном методе определения (п. II.1.А.5).

II.1.Б.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения

Та же, что и при количественном методе определения (п. II.1.А.6).

II.1.Б.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

II.1.Б.7.1. Подготовка проб молока (сгущённого, концентрированного), молочных смесей (сухие, восстановленные, жидкие)

Образцы продуктов в концентрированном виде предварительно разводят: 1 г сухого продукта суспендируют в 4 $см^3$ дистиллированной воды. Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. II.1.А.6.6), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

Далее пробоподготовку проводят по п. II.1.А.7.1.

При расчете конечного результата для концентрированных продуктов учитывают фактор разбавления – 50.

Пробоподготовку жидких продуктов проводят по п. II.1.А.7.1.1 и II.1.А.7.1.2.

Образцы сухих продуктов гомогенизируют в дистиллированной воде: 1 г сухого продукта суспендируют в 4 $см^3$ дистиллированной воды. Далее пробоподготовку проводят в по п. II.1.А.7.1.3.

При расчете конечного результата для концентрированных продуктов учитывают фактор разбавления – 50.

II.1.Б.7.2. Подготовка проб молочных продуктов

II.1.Б.7.2.1. Продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие, продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога и молокосодержащие, сметанные продукты и продукты сметанные молокосодержащие, молочные напитки на основе сыворотки, сливки (сгущённые, концентрированные)

Пробоподготовку для неконцентрированных продуктов проводят по п. II.1.А.7.2.1.

Образцы продуктов в концентрированном виде предварительно разводят: 1 г сухого продукта суспендируют в 4 $см^3$ дистиллированной воды. Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. II.1.А.6.6), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

Далее пробоподготовку проводят по п. II.1.А.7.2.1. При расчете конечного результата для концентрированных продуктов учитывают фактор разбавления – 50.

II.1.Б.7.2.2. Спреды сливочно-растительные

Пробоподготовку проводят по п. II.1.А.7.2.2.

II.1.Б.7.2.3. Молокосодержащие продукты сырные

Пробоподготовку проводят по п. II.1.А.7.2.3.

II.1.Б.7.3. Подготовка проб продуктов из мяса и субпродуктов: колбасные изделия, консервы мясные (с содержанием мясных ингредиентов более 50 %)

Пробоподготовку продуктов с содержанием жира менее 5 % проводят по п. II.1.А.7.3.2, с содержанием жира более 5 % – по п. II.1.А.7.3.1.

II.1.Б.7.4. Подготовка проб переработанной продукции из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)

Пробоподготовку проводят по п. II.1.А.7.4.

II.1.Б.7.5. Подготовка проб яичных продуктов сухих (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок)

Образцы сухих продуктов гомогенизируют в дистиллированной воде: 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды. Далее пробоподготовку проводят по п. II.1.А.7.5.

При расчете конечного результата для концентрированных продуктов учитывают фактор разбавления – 600 (в пересчете на сухой продукт).

II.1.Б.7.6. Спреды растительно-жировые

Пробоподготовку проводят по п. II.1.А.7.2.2.

II.1.Б.7.7. Биологически активные добавки к пище на основе переработки мясо-молочного сырья, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %)

Методика описывает пробоподготовку для БАД к пище на основе животного сырья, не включающих в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (солей йода, лизоцим и т. п.).

Экстракцию антибиотиков тетрациклиновой группы из исследуемых образцов БАД проводят следующим образом.

Всё количество представительной пробы БАД в форме таблеток, капсул, порошка, сухих форм (например, чипсы) полностью измельчают в гомогенизаторе или в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. БАД в виде сухого порошка тщательно перемешивают в блендере.

Далее готовят 20%-ю суспензию гомогенизированной пробы. Для этого 1 г навески сухого продукта разводят в 4 $см^3$ дистиллированной воды, вновь тщательно перемешивают, встряхивают до полного растворения/суспендирования на вортексе в течение 1 мин и потом перемешивают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Далее экстракцию подготовленной таким образом пробы проводят:

– для БАД на основе переработки молочного сырья – по п. I.1.А.7.1, как для жидкого продукта.

При расчете конечного результата на сухой продукт учитывают фактор разбавления – 50;

– для БАД на основе переработки мясного сырья – берут 1 г подготовленной 20%-й суспензии и проводят экстракцию по п. II.1.А.7.3.1 как с гомогенизированной пробой.

При расчете конечного результата на сухой продукт учитывают фактор разбавления – 50;

– для БАД на основе переработки рыбного сырья и аквакультуры (кроме рыбьего жира) – берут 1 г подготовленной 20%-й суспензии и проводят экстракцию по п. II.1.А.7.4 как с гомогенизированной пробой.

При расчете конечного результата на сухой продукт учитывают фактор разбавления – 50.

II.1.Б.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

По п. II.1.А.8.

II.1.Б.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

По п. II.1.А.9.

Факторы разбавления для расчета содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в различных пробах при полуколичественном методе определения в соответствии с табл. 2.4.

Таблица 2.4

Факторы разбавления для расчета содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
1	2
Молочные смеси (восстановленные, жидкие)	10
Молоко (сгущённое, концентрированное) Сливки (сгущённые, концентрированные)	50
Молочные смеси (сухие) (в сухом продукте) БАД к пище на молочной основе (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) (сухие)	50 (при коэффициенте восстановления 5)
Продукты кисломолочные и сквашенные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) жидкие Продукты творожные (с фруктовыми наполнителями/без наполнителей) на основе творога и молокосодержащие Молочные напитки на основе сыворотки Сметанные продукты и продукты сметанные молокосодержащие	10
Спреды (все виды)	20
Молокосодержащие продукты сырные	25
Субпродукты скота и птицы	10

Продолжение табл. 2.4

1	2
Продукты из мяса и субпродуктов: колбасные изделия, консервы мясные (с содержанием мясных ингредиентов более 50 %)	20
Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры (консервы натуральные и с добавлением масла, молочных и яичных компонентов, в том числе для детского питания (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)	10
Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок) (в сухом продукте)	600
БАД к пище на основе переработки мясного, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %) (в сухом продукте) (при коэффициенте разведения – 50)	50

II.1.Б.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

II.1.Б.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если выявлено содержание антибиотика выше предела определения (минимальной границы диапазона) для соответствующего вида продукта (табл. 2.3), то результат анализа представляют в виде:

«*антибиотики тетрациклиновой группы в молоке обнаружены*».

Если выявлено содержание антибиотика ниже предела определения (минимальной границы диапазона) для соответствующего вида продукта (табл. 2.3), то результат анализа представляют в виде:

«*антибиотики тетрациклиновой группы в молоке не обнаружены*».

II.1.Б.12. Подтверждение результата полуколичественного определения

При исследовании полуколичественным методом необходимо подтверждение полученного результата на уровне и выше МДУ для тетрациклина с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение II
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы для определения антибиотиков тетрациклиновой группы

(на примере RIDASCREEN® Tetracyclin арт. R3505)[4]

Тест-система для количественного определения антибиотиков тетрациклиновой группы по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

2. Комплект стандартных концентрированных растворов тетрациклина 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.

3. Конъюгат – 10 см^3.

4. Антитела – 6 см^3.

5. Готовая смесь субстрата с хромогеном, содержащая пероксид карбамида и тетраметилбензидин, – 10 см^3.

6. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 14 см^3.

7. Буфер 1 для проб для разбавления стандартных растворов и образцов, используется при анализе образцов масла, мёда, мяса, колбасных изделий, рыбы, креветок и цельного яйца – 60 см^3.

8. 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.

9. PBS-буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина, – 1 пакет.

Наборы рассчитаны на проведение анализа в 2 повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

Специфичность методики определения антибиотиков тетрациклиновой группы, установленная по перекрестной чувствительности к соответствующим антибиотикам в буферной системе (на примере RIDASCREEN® Tetracyclin, арт. R3505), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
Тетрациклин (вещество стандарта)	100
Хлортетрациклин	70
Ролитетрациклин	34
Демеклоциклин	26
Окситетрациклин	13
Миноциклин	3
Доксициклин	2

[4] Допускается использование тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Специфичность к антибиотикам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

Схема заполнения лунок планшета

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	К1	К1	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
B	К2	К2	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
C	К3	К3	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
D	К4	К4	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
E	К5	К5	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
F	К6	К6	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

II.2. Определение антибиотиков тетрациклиновой группы методами подтверждающего анализа на основе ВЭЖХ-МС

II.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы проводится в молоке и молочных продуктах, яйцах и яичном порошке, органах и тканях животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) по ГОСТ 31694—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 1,0—1 000,0 мкг/кг.

II.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотиков на уровнях, близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ 31694—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотиков, обнаруженных методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ 31694—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержания антибиотиков в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчет берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотиков в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода определения равно или выше МДУ – необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотиков проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотиков проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотиков в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствуют антибиотики, определенные методом ИФА, дополнительного количества антибиотиков. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времен удерживания пиков антибиотиков пробы и антибиотиков добавки, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Отмечаем, что проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ 31694—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия антибиотиков тетрациклиновой группы в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

II.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотиков в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженные вещества в составе образца совпадают как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со сравнительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандартов антибиотиков;

б) соотношение сигнал/шум полученных пиков определяемых антибиотиков в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотиков в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае невыполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

II.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ 31694—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

а) ***по рыбе***

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2016.24846.

– Свидетельство № 310354-0023/2015 от 23.12.2015;

б) ***по продукции животноводства***

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2009.06265.

– Свидетельство № 32-09 от 19.06.2009.

Раздел III. Определение остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения

III.1. Определение остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

III.1.А. Методика количественного определения остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения

Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0041.24.04.18 от 24 апреля 2018 г.

III.1.А.1. Область применения количественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок количественного определения остаточных количеств бацитрацина путём конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией (при 450 нм) (далее – ИФА) для пищевых продуктов животного происхождения, в том числе для молока (сырого, питьевого, сухого); мяса скота и птицы; яиц (сырого, замороженного); рыбы и рыбных консервов, в том числе для детского питания.

Определение остаточных количеств бацитрацина количественным методом (А) проводят для следующих групп продуктов животного происхождения:

1. Молоко (сырое, питьевое, сухое). Предел определения в молоке и молочных продуктах – 0,011 мг/кг.

2. Мясо скота и птицы. Предел определения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,009 мг/кг.

3. Яйца (сырые, замороженные). Предел определения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,011 мг/кг.

4. Рыба и рыбные консервы, в том числе для детского питания. Предел определения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,009 мг/кг.

III.1.А.2. Методика измерений при количественном методе определения

Количественное определение бацитрацина в пищевых продуктах основано на технологии твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа, в основе которого лежит взаимодействие «антиген – антитело»: лунки микротитровального планшета покрыты антителами к бацитрацину и после внесения в лунки смеси, содержащей антиген (стандартные растворы бацитрацина, коньюгат бацитрацина с ферментом или

подготовленная проба продукта), свободный бацитрацин и коньюгат бацитрацина конкурируют за центры связывания антител к бацитрацину. Несвязавшийся коньюгат удаляется в процессе промывки. После добавления в лунки раствора субстрата/хромогена фермент в составе связавшегося с антителами к бацитрацину коньюгата взаимодействует с субстратом, превращая хромоген в вещество голубого цвета. Добавление стоп-реагента приводит к изменению цвета с голубого на желтый. Оптическую плотность прореагировавшей смеси измеряют фотометрически при 450 нм, по результатам измерения судят о количестве бацитрацина в исследуемой пробе (величина оптической плотности раствора обратно пропорциональна концентрации бацитрацина в исследуемой пробе продукта). Расчёт содержания бацитрацина проводят по стандартной кривой или с помощью специального программного обеспечения.

III.1.A.3. Метрологические характеристики количественного метода определения

III.1.A.3.1. Метрологические характеристики количественного метода определения остаточных количеств бацитрацина в продуктах питания животного происхождения, проводимого в полном соответствии с приведенной процедурой твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа, представлены в табл. 3.1.

Таблица 3.1

Метрологические характеристики количественного определения остаточных количеств бацитрацина в пищевых продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа

Пищевые продукты	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности, $P = 0{,}95$), $\pm \delta$, %	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	0,01—0,20	41	4,9	6,9	14	19	99
Мясо скота и птицы	0,01—0,25	47	8,2	11,5	23	32	122

Продолжение табл. 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8
Яйца (сырые, замороженные)	0,01—0,27	48	9,0	12,6	25	35	110
Рыба	0,01—0,27	54	5,0	7,0	14	20	110
Рыбные консервы, в том числе для детского питания	0,01—0,27	50	5,4	7,6	15	21	99

III.1.А.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для количественного метода определения

III.1.А.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с переменным объемом от 0,02 до 0,2 $см^3$ и от 0,1 до 1 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы восьмиканальные с переменным объемом от 0,05 до 0,3 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г

Фотометр вертикального типа фотометрирования (микропланшетный иммуноферментный анализатор) с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—3,0 и светофильтром на 450 нм

Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА

pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01, не более

Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 $см^3$ ГОСТ 1770—74

Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2, вместимостью 25, 1 000 см^3	ГОСТ 1770—74
Пипетки (с делениями) 2-го класса точности объемом 1, 2, 5 и 10 см^3	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81)

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

III.1.А.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (50 ± 1) °С	
Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Измельчитель-гомогенизатор или фарфоровые ступки с пестиками	
Конические колбы на 50 и 100 см^3 с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932—90
Магнитная мешалка	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 и 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 типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 см^3	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[5] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[5] до 20 000 g	
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин	

[5] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин;
Шкаф (стол) лабораторный

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

III.1.А.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Натрия гидроокись, хч	ГОСТ 4328

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

III.1.А.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для количественного определения бацитрацина по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включающая следующие компоненты (RIDASCREEN® Bacitracin арт. R2901):

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), покрытый антителами к бацитрацину, в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

2. Комплект стандартных растворов бацитрацина в воде (по 1 $см^3$ каждый, нулевой стандарт – 2 $см^3$) с концентрациями: 0 (нулевой стандарт); 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 мкг/$дм^3$ бацитрацина в воде).

3. Конъюгат бацитрацина с пероксидазой, концентрат (×100) – 0,1 $см^3$.

4. Готовая смесь субстрата с хромогеном – 12 $см^3$.

5. Стоп-реагент (1 н серная кислота) – 15 $см^3$.

6. Буфер для разбавления проб, готовый к употреблению – 40 $см^3$.

7. Буфер для разбавления конъюгата, готовый к употреблению – 15 $см^3$.

8. Буфер для промывки, концентрат (×20) – 30 $см^3$.

Набор рассчитан на проведение анализа в 2 повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

III.1.А.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА бацитрацина проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковос-

пламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-наборов.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;

– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

III.1.А.6. Подготовка к исследованию для количественного метода определения

III.1.А.6.1. 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.

III.1.А.6.2. Подготовка оборудования

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

III.1.А.6.3. Хранение и использование наборов и реагентов

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

III.1.А.6.4. Приготовление 80%-го раствор метанола

Для приготовления 80%-го раствора метанола в буфере для разбавления проб (входит в комплект набора) в количестве, необходимом для экстракции, смешивают метанол и буфер в соотношении 4 + 1 (напри-

мер, к 8 см^3 метанола прибавляют 2 см^3 буфера для разбавления проб, данный объём достаточен для экстракции 5 проб). Раствор тщательно перемешивают.

III.1.А.6.5. Приготовление моющего буферного раствора

Для приготовления буфера для промывки разбавляют исходный концентрированный раствор буфера в 20 раз деминерализованной водой в соотношении 1 + 19 (например, к 2 см^3 концентрата прибавляют 38 см^3 деминерализованной воды). Раствор тщательно перемешивают.

Поскольку разбавленный буфер для промывки хранению не подлежит, его готовят непосредственно перед использованием, рассчитывая необходимое его количество для проведения анализа. Например, 40 см^3 разведенного раствора буфера для промывки достаточно для 4 микротитровальных стрипов по 8 лунок в каждом.

III.1.А.6.6. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия (для нейтрализации образцов)

Навеску 4,0 г гидроокиси натрия, разводят в мерной колбе объемом 250 см^3 дистиллированной водой до метки. Раствор тщательно перемешивают.

III.1.А.6.7. Приготовление раствора конъюгата

Готовится непосредственно перед анализом.

Для приготовления раствора конъюгата бацитрацина с пероксидазой необходимо отцентрифугировать флакон (виалу) с концентратом в течение 1 мин при 1 000 g при комнатной температуре (20—25) °С.

Поскольку разбавленный раствор конъюгата имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Для приготовления готового раствора концентрат разбавляют в 100 раз в соотношении 1 + 99 буфером для разбавления конъюгата (например, 0,02 см^3 концентрата конъюгата смешивают с 1,980 см^3 буфера, данный объём достаточен для 4 стрипов).

III.1.А.7. Подготовка проб пищевых продуктов для количественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

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

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

III.1.А.7.1. Подготовка проб молока (сырое, питьевое, сухое)

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документации на продукт) при отсутствии информации 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды.

Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. III.1.А.6.6), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5, после чего центрифугируют в течение 5 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 в течение 20—30 мин).

Образовавшийся верхний слой жира удаляют с помощью шпателя или стеклянной палочки, обезжиренный супернатант разбавляют в 10 раз (соотношение 1 + 9) буфером для разбавления проб (в комплекте набора) (например, к 0,02 $см^3$ обезжиренного супернатанта добавляют 0,18 $см^3$ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе.

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

III.1.А.7.2. Подготовка проб мяса скота и птицы, яиц, рыбы, рыбных консервов, в том числе для детского питания

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

Навеску 1 г гомогенизированной пробы вносят в центрифужную пробирку объёмом 15 $см^3$, добавляют 2 $см^3$ 80%-го раствора метанола в буфере (п. III.1.А.6.4) для проб, перемешивают встряхиванием в течение 15 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом), центрифугируют при 2 000 g в течение 10 мин при комнатной температуре (20—25 °С), супернатант отбирают в пустую пробирку.

Супернатант разбавляют в 5 раз (соотношение 1 + 4) буфером для разбавления проб (в комплекте набора) (например, к 0,04 $см^3$ супернатанта добавляют 0,16 $см^3$ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе.

Для анализа вносят по 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта в лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 15.

III.1.А.8. Проведение исследований при количественном методе определения

III.1.А.8.1. Общие положения

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.

2. 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.

III.1.А.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-набора доводят температуру всех реагентов до комнатной температуры (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

III.1.А.8.3. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводят поэтапно.

1. В рамку планшета вставляют необходимое количество микролунок, достаточное для всех растворов стандартов и растворов исследуемых

проб при анализе в двух повторностях каждый. Записывают положения лунок со стандартами и исследуемыми растворами на бланке планшета.

2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 см^3 каждой концентрации раствора стандарта или раствора подготовленной пробы продукта, после чего в каждую лунку добавляют по 0,05 см^3 разбавленного коньюгата (п. III.1.А.6.7). Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 1 часа в темном месте.

3. По окончании инкубации выливают жидкость из лунок, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Заполняют лунки буфером для промывки, подготовленным по п. III.1.А.6.5, внося по 0,3 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.

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

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 (20—25 °С) в течение 30 минут в темном месте.

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

III.1.А.9. Учёт и обработка результатов при количественном методе определения

III.1.А.9.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на микропланшетном иммуноферментном анализаторе (планшетный фотометр, ридер) при длине волны 450 нм против нулевого стандарта, значение которого принимается за 100 %.

Величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,6 ($А_{450нм} < 0,6$) является признаком порчи реагентов. Результаты анализа в таком случае не учитываются.

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

III.1.А.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа используется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

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

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

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

X – концентрация антибиотика в растворе, мкг/дм^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \quad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы.

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

Ш.1.А.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов антибиотика (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

Ш.1.А.9.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации антибиотика в мкг/кг строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

Ш.1.А.9.5. Концентрацию антибиотика (x) в мкг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

Ш.1.А.9.6. Массовую концентрацию (содержание) бацитрацина в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

x – массовая концентрация бацитрацина в экстракте испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, мкг/дм^3 (мкг/кг);

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 3.2;

K – коэффициент пересчета мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000.

Таблица 3.2

Факторы разбавления для расчета содержания бацитрацина в различных пробах

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

Ш.1.А.10. Проверка приемлемости результатов параллельных определений при количественном методе определения

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости:

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r, \text{ где}$$

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.

III.1.A.11. Оформление результатов при количественном методе определения

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:

$$\Delta = \delta \frac{X}{100}, \text{ где}$$

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

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«*содержание бацитрацина в яйце < 0,0110 мг/кг*».

III.1.A.12. Контроль точности результатов измерения при количественном методе определения

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

III.1.Б. Методика полуколичественного определения остаточных количеств бацитрацина в пищевой продукции животного происхождения

III.1.Б.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств бацитрацина методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) для следующих групп пищевых продуктов животного происхождения:

1. Молочные смеси, в том числе для детского питания (сухие, жидкие, восстановленные). Предел обнаружения в молоке и молочных продуктах – 0,011 мг/кг (мг/дм^3).

2. Мясо- и птицепродукты

а) субпродукты скота и птицы, жир-сырец. Предел обнаружения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,009 мг/кг;

б) продукты из мяса и субпродуктов, в том числе птичьих, с содержанием мясных ингредиентов более 50 % (колбасные изделия, консервы мясные, в том числе для детского питания). Предел обнаружения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,009 мг/кг.

3. Рыбная продукция, продукция аквакультуры

а) рыбная продукция и продукция аквакультуры (рыба, креветки) сырая, варёно-мороженая. Пределы обнаружения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,009 мг/кг;

б) переработанная продукция из рыбы и аквакультуры с содержанием рыбных ингредиентов более 50 % (консервы натуральные с добавлением масла), кулинарные продукты из рыбы с яичным компонентом для детского питания. Пределы обнаружения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,009 мг/кг.

4. Яйца и яйцепродукты

Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок). Предел обнаружения бацитрацина (по стандартному веществу) – примерно 0,11 мг/кг (в сухом продукте).

5. Биологически активные добавки к пище на основе мясного, рыбного сырья и аквакультуры (кроме рыбьего жира), не включающие в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (соли йода, лизоцим и т. п.) (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %). Пределы определения бацитрацина (по стандартному веществу) – 0,043 мг/кг (в пересчете на сухой продукт).

III.1.Б.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

Та же, что и для количественного метода определения (п. III.1.А.2).

III.1.Б.3. Пределы полуколичественного метода определения

Таблица 3.3

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств бацитрацина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа

Пищевые продукты	Пределы определения, мг/кг ($мг/дм^3$)
1	3
Молочные смеси, в том числе для детского питания (жидкие, восстановленные)	0,011

Продолжение табл. 3.3

1	3
Молочные смеси, в том числе для детского питания (сухие, на сухой продукт)	0,110
Субпродукты скота и птицы	0,009
Продукты из мяса и субпродуктов, в том числе птичьих, с содержанием мясных ингредиентов более 50 % (колбасные изделия, консервы мясные, в том числе для детского питания)	0,009
Рыбная продукция и продукция аквакультуры (рыба, креветки) сырая, варёно-мороженая (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %)	0,009
Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры с содержанием рыбных ингредиентов более 50 % (консервы натуральные с добавлением масла), кулинарные продукты из рыбы с яичным компонентом для детского питания	0,009
Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок)	0,110
БАД к пище на основе переработки мясного, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %) (кроме рыбьего жира) (в сухом продукте)	0,043

III.1.Б.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

III.1.Б.4.1. Средства измерений

Те же, что и для количественного метода определения (п. III.1.А.4.1).

III.1.Б.4.2. Вспомогательные устройства, посуда, материалы

Те же, что и для количественного метода определения (п. III.1.А.4.2).

III.1.Б.4.3. Реактивы

Те же, что и для количественного метода определения (п. III.1.А.4.3).

III.1.Б.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением III (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

III.1.Б.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при количественном методе определения

Те же, что и для количественного метода определения (п. III.1.А.5).

III.1.Б.6. Подготовка к исследованию для полуколичественного метода определения

Та же, что и для количественного метода определения (п. III.1.А.6).

III.1.Б.7. Подготовка проб для полуколичественного метода определения

III.1.Б.7.1. Подготовка проб молочных продуктов

Молочные смеси, в том числе для детского питания (жидкие, восстановленные) – пробоподготовка по п. III.1.А.7.1.

III.1.Б.7.2. Подготовка проб мяса скота и птицы, яиц, рыбной продукции (рыбных консервов), продукции аквакультуры

III.1.Б.7.2.1. Субпродукты скота и птицы, продукты из мяса и субпродуктов, в том числе птичьих, с содержанием мясных ингредиентов более 50 % (колбасные изделия, консервы мясные, в том числе для детского питания), рыбная продукция и продукция аквакультуры (рыба, креветки) сырая, варёно-мороженая, рыбные консервы (с содержанием рыбных ингредиентов более 50 %), кулинарные продукты из рыбы с яичным компонентом для детского питания.

Пробоподготовка по п. III.1.А.7.2.

III.1.Б.7.2.2. Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок) масла)

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документации на продукт). При отсутствии информации 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды. Далее проводят пробоподготовку как для яиц (сырых) по п. III.1.А.7.2.

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 150 (на сухой продукт).

III.1.Б.7.2.3. Биологически активные добавки к пище на основе переработки мясного, рыбного сырья и аквакультуры (кроме рыбьего жира) (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %)

Методика описывает пробоподготовку для БАД к пище на основе животного сырья, не включающих в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (соли йода, лизоцим и т. п.).

Экстракцию бацитрацина из исследуемых образцов БАД на основе переработки мясного, рыбного сырья и аквакультуры (кроме рыбьего жира) проводят следующим образом.

Всё количество представительной пробы БАД в форме таблеток, капсул, порошка, сухих форм (например, чипсы) полностью измельчают в гомогенизаторе или в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. БАД в виде сухого порошка тщательного перемешивают в блендере.

Далее готовят 20%-ю суспензию гомогенизированной пробы, для этого 1 г навески сухого продукта разводят в 4 $см^3$ дистиллированной воды, вновь тщательно перемешивают, встряхивают до полного растворения/суспендирования на вортексе в течение 1 мин и потом перемешивают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

После чего берут 1 г подготовленной 20%-й суспензии и проводят экстракцию по п. Ш.1.А.7.2, как с гомогенизированной пробой (при пересчёте на сухой продукт дополнительно учитывают коэффициент разведения – 5).

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 75.

Ш.1.Б.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

Так же, как и при количественном методе определения (п. Ш.1.А.8).

Ш.1.Б.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

Так же, как и при количественном методе определения (п. Ш.1.А.9).

Факторы разбавления для расчета содержания бацитрацина в различных пробах при полуколичественном методе определения в соответствии с табл. 3.4.

Таблица 3.4

Факторы разбавления для расчета содержания бацитрацина в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
1	2
Молочные смеси, в том числе для детского питания (жидкие, восстановленные)	10
Молочные смеси, в том числе для детского питания (сухие, на сухой продукт)	100
Субпродукты скота и птицы	15
Продукты из мяса и субпродуктов, в том числе птичьих с содержанием мясных ингредиентов более 50 % (колбасные изделия, консервы мясные, в том числе для детского питания)	15

Продолжение табл. 3.4

1	2
Рыбная продукция и продукция аквакультуры (рыба, креветки) сырая, варёно-мороженая, кулинарные продукты из рыбы с молочным компонентом для детского питания	15
Переработанная продукция из рыбы и аквакультуры с содержанием рыбных ингредиентов более 50 % (консервы натуральные с добавлением масла)	15
Яичные продукты сухие (яичный порошок, меланж, сухой яичный белок)	150
БАД к пище на основе переработки мясного, рыбного сырья и аквакультуры (с содержанием ингредиентов животного происхождения более 90 %) (в сухом продукте)	75

III.1.Б.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

Так же, как и при количественном методе определения (п. III.1.А.10).

III.1.Б.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если содержание бацитрацина выше предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 3.3), то результат анализа представляют в виде:

«*бацитрацин в яйце обнаружен*».

Если содержание бацитрацина ниже предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 3.3), то результат анализа представляют в виде:

«*бацитрацин в яйце не обнаружен*».

III.1.Б.12. Подтверждение результата полуколичественного определения

При исследовании полуколичественным методом необходимо подтверждение полученного результата на уровне и выше МДУ для бацитрацина с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение III
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы для определения бацитрацина
(на примере RIDASCREEN® Bacitracin арт. R2901)[6]

Набор для количественного определения антибиотиков тетрациклиновой группы по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), покрытый антителами к бацитрацину, в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

2. Комплект стандартных растворов бацитрацина в воде (по 1 $см^3$ каждый, нулевой стандарт – 2 $см^3$) с концентрациями: 0 (нулевой стандарт); 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 мкг/$дм^3$ бацитрацина в воде).

3. Конъюгат бацитрацина с пероксидазой, концентрат (×100) – 0,1 $см^3$.

4. Готовая смесь субстрата с хромогеном – 12 $см^3$.

5. Стоп-реагент (1 н серная кислота) – 15 $см^3$.

6. Буфер для разбавления проб, готовый к употреблению – 40 $см^3$.

7. Буфер для разбавления конъюгата, готовый к употреблению – 15 $см^3$.

8. Буфер для промывки, концентрат (×20) – 30 $см^3$.

Набор рассчитан на проведение анализа в 2 повторностях 41 исследуемого образца и 7 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

Специфичность методики определения бацитрацина установленная по перекрестной чувствительности к исследованным антибиотикам в буферной системе (на примере тест-системы RIDASCREEN® Bacitracin арт. R2901), представлена ниже.

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

Специфичность к антибиотикам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

[6] Допускается использование тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

III.2. Определение бацитрацина методами подтверждающего анализа на основе ВЭЖХ-МС

III.2.1. Назначение и область применения

Определение массовой доли цинкбацитрацина проводится в мясе, включая мясо птицы, субпродуктах, мясных и мясосодержащих продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по ГОСТ 33934—16 «Мясо и мясные продукты. Определение цинкбацитрацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 0,02—100 мг/кг.

III.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотика на уровнях, близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ 33934—16 «Мясо и мясные продукты. Определение цинкбацитрацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотика, обнаруженного методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ 33934—16 «Мясо и мясные продукты. Определение цинкбацитрацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержания антибиотика в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчет берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотика в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода определения равно или выше МДУ – необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотика проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотика проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотика в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствует антибиотик, определенный методом ИФА, дополнительного количества антибиотика. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времени удерживания пиков антибиотика пробы и антибиотика добавленного, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Отмечаем, что проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ 33934—16 «Мясо и мясные продукты. Определение цинкбацитрацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия цинкбацитрацина в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

III.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотика в исследованной пробе считается подтвержденным, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженное вещество в составе образца совпадает как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со сравнительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандарта антибиотика;

б) соотношение сигнал/шум полученного пика определяемого антибиотика в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотика в исследуемой пробе считается подтвержденным в случае невыполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

III.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ 33934—16 «Мясо и мясные продукты. Определение цинкбацитрацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2017.25618.

– Свидетельство № 253.0138/01.00258/2016 от 11.07.2016.

Раздел IV. Определение остаточных количеств аминогликозидов (стрептомицин) в пищевой продукции животного происхождения

IV.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств аминогликозидов (стрептомицин) в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

IV.1.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств стрептомицина методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) для следующих групп пищевых продуктов животного происхождения:

1. Молоко и молочные продукты

а) молоко, сливки (сырые, питьевые, сухие, концентрированные). Пределы обнаружения стрептомицина (по стандартному веществу): молоко, сливки – 0,005 мг/дм^3; сухое молоко (в восстановленном) – 0,003 мг/кг;

б) продукты переработки молока продукты: творог, сыр, масло из коровьего молока, спреды сливочно-растительные, молочные смеси, в том числе для детского питания. Пределы обнаружения стрептомицина (по стандартному веществу): творог, сыр – 0,022 мг/кг, масло, спреды сливочно-растительные – 0,026 мг/кг, молочные смеси (восстановленные) – 0,003 мг/ кг.

2. Мясо и субпродукты скота и птицы

Мясо (говядина, свинина, птица), печень, почки (свиные и говяжьи). Пределы обнаружения стрептомицина (по стандартному веществу): мясо скота – 0,022 мг/кг, птица – 0,028 мг/кг; печень – 0,023 мг/кг; почки – 0,018 мг/кг.

3. Рыба, продукция аквакультуры, кулинарные продукты из рыбы с молочным компонентом для детского питания

а) рыба, креветки. Пределы обнаружения стрептомицина (по стандартному веществу) примерно: рыба – 0,028 мг/кг, креветки – 0,020 мг/кг.

4. Масло-жировая продукция (спреды растительно-сливочные)

Предел обнаружения стрептомицина (по стандартному веществу) – 0,026 мг/кг.

5. Мёд

Предел обнаружения стрептомицина (по стандартному веществу) – 0,002 мг/кг.

6. Биологически активные добавки к пище на основе переработки молочного сырья, не включающие в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (соли йода, лизоцим и т. п.) (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %). Пределы определения стрептомицина (по стандартному веществу), мг/кг: 0,05 (в пересчёте на сухой продукт).

IV.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

В основе принципа действия тест-системы лежит реакция «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты антителами захвата к антителам к стрептомицину. На микротитровальный планшет уже нанесены антитела к стрептомицину, связанные иммобилизированными антителами захвата. В лунки дозируют растворы стандартов или проб и конъюгат стрептомицина. Свободный стрептомицин и стрептомицин из конъюгата конкурируют за места связывания с антителами (конкурентный иммуноферментный анализ). Все несвязанные молекулы конъюгата затем удаляются на этапе отмывки.

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 стрептомицина в пробе.

IV.1.3. Пределы полуколичественного метода определения

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств стрептомицина в пищевых продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств стрептомицина в пищевых продуктах методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения*, мг/кг (мг/дм^3)	Среднее значение открываемости (степень извлечения по стандартному веществу), %
1	2	3
Молоко (сырое, свежее, пастеризованное, цельное, обезжиренное), молоко восстановленное, сливки, молочные смеси, в том числе для детского питания (жидкие)	0,005	110

Продолжение табл. 4.1

1	2	3
Молоко и молочные смеси, в том числе для детского питания (сухие) с предварительным восстановлением (в сухом продукте)	0,047	107
Сыр, творог, сливочное масло, спреды все виды	0,022	87
Мясо скота	0,028	89
Мясо птицы	0,028	95
Печень скота и птицы	0,028	90
Почки скота и птицы	0,031	81
Рыба, креветки	0,033	76
Мёд	0,023	87
БАД к пище на основе переработки молочного сырья (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) (в сухом продукте)	0,05	103
* В отношении стрептомицина, к которому определена чувствительность		

IV.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

IV.1.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 $см^3$ и от 0,1 до 5 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы многоканальные с переменным объемом 0,03—0,3 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г

Фотометр вертикального типа – планшетный иммуноферментный анализатор с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и длиной волны 450 нм

Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА	
pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01, не более	
Цилиндры мерные, стаканы химические вместимостью 25, 50, 100 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2, вместимостью 50, 100 и 200 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пипетки (с делениями) 2-го класса точности объемом 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81)

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

IV.1.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (90 ± 1) °C	
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов, или фарфоровые ступки с пестиками)	
Конические колбы на 50 и 100 $см^3$ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932—90
Магнитная мешалка	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 $см^3$ однократного применения	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 $см^3$	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 $см^3$	
Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 $см^3$	
Устройство для испарения экстрактов или центрифужный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °C	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением	

(ОЦУ/RFS)[7] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[7] до 20 000 g
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин
Шкаф (стол) лабораторный
Шпатель или стеклянная палочка (для удаления жирного слоя из проб)
Колонки для твердофазной экстракции (например, RIDA® C18 арт. R2002) по Приложению IV (рекомендуемое).
Устройство для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд) или пластиковый шприц на 20 $см^3$ с резиновой пробкой (при экстракции проб мёда)

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

IV.1.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Гептансульфоновой кислоты натриевая соль для ВЭЖХ	
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Натрий фосфорнокислый трехзамещенный 12-водный (трисодиумфосфат) ($Na_3PO_4 \times 12H_2O$), чда	
Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), хч	ГОСТ 4172—76
Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$), хч	ГОСТ 245—76
Натрий хлористый (HCl), хч	ГОСТ 4233

[7] Пересчёт относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

Ортофосфорная кислота (H_3PO_4) 85%-я, чда

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

IV.1.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением IV (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

IV.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-наборов.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;

– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

IV.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения

IV.1.6.1. 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.

IV.1.6.2. Подготовка оборудования

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

IV.1.6.3. Хранение и использование наборов и реагентов

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

IV.1.6.4. Приготовление 10 мМ моющего буферного раствора с pH 7,4 (PBS-буфер с твином)

Способ 1. Используют пакет с солью для приготовления моющего буфера, входящий в комплект набора. Растворяют содержимое целого пакетика в 1 $дм^3$ дистиллированной воды. Готовый 10 мМ моющий буфер может храниться при температуре 2—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 (20—25 °С).

Для приготовления готового к употреблению 10 мМ моющего буфера растворяют одну часть 10-кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

IV.1.6.5. Приготовление буферного раствора PBS для разбавления проб (PBS-буфер)

Навески: 0,63 г натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного; 5,7 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного и 9 г NaCl; довести до 1 000 $см^3$ дистиллированной водой в мерной колбе, тщательно перемешать.

IV.1.6.6. Приготовление 0,5 н раствор гидроокиси натрия

Для приготовления 0,5 н раствора гидроокиси натрия навеску гидроокиси натрия массой 4,0 г развести в мерной колбе объемом 250 $см^3$ дистиллированной водой до метки.

IV.1.6.7. Приготовление 3,4%-го (по объему) раствора ортофосфорной кислоты

Отобрать 4 $см^3$ ортофосфорной кислоты 85%-й в мерную колбу на 100 $см^3$ и довести до метки дистиллированной водой.

IV.1.6.8. Приготовление экстракционного буфера (раствор 50 мМ натриевая соли гептансульфоновой кислоты с 25 мМ трисодиумфосфат с pH 2,0)

Навески 2,0 г натриевой соли гептан-сульфоновой кислоты и 1,9 г тринатрийфосфата 12-водного растворить в 170—190 $см^3$ дистиллированной воды, установить pH ортофосфорной кислотой до 2,0 ± 0,1, довести до конечного объёма – до 200 $см^3$.

IV.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

IV.1.7.1. Подготовка проб молока (сырого, свежего, пастеризованного, обезжиренного, цельного), сливок, сухого молока, молочных смесей, в том числе для детского питания (жидких, сухих)

Образцы продуктов в сухом виде при необходимости предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (в нормативно-технической документации на продукт). Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 М раствора NaOH, доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5, после чего центрифугируют в течение 5 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 в течение 20—30 минут).

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

IV.1.7.1.1. Молоко (сырое, свежее, пастеризованное, цельное, обезжиренное), молоко восстановленное, сливки, молочные смеси, в том числе для детского питания (жидкие)

Обезжиренную пробу исследуемого продукта перемешивают на вортексе в течение 3 с, разбавляют в соотношении 1 : 10 (1 + 9) буфером для разбавления проб (п. IV.1.6.5) (например, 0,05 см^3 молока + 0,45 см^3 буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10, для сухих продуктов дополнительно учитывают коэффициент восстановления.

IV.1.7.1.2. Сухие молоко и молочные смеси, в том числе для детского питания

Навеску исследуемого сухого продукта массой 1 г разводят в деминерализованной воде до объема 10 см^3 и перемешивают на вортексе до полного растворения.

Пробу исследуемого продукта центрифугируют в течение 5 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).

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

Обезжиренный супернатант разбавляют в соотношении 1 : 10 (1 + 9) буфером для разбавления проб (IV.1.6.5) (например, 0,05 см^3 молока + 0,45 см^3 буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата (в пересчете на сухой продукт) учитывают фактор разбавления – 100.

IV.1.7.1.3. Сыр, творог, сливочное масло, спреды сливочно-растительные, растительно-сливочные

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

Навеску исследуемого продукта массой 1 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3, добавляют 4 см^3 готового моющего буфера PBS-буфера с твином (IV.1.6.4). Пробирки термостатируют на водяной бане при температуре 50—55 °С до полного расплавления пробы,

не менее 2 мин, после чего интенсивно перемешивают на вортексе в течение 10—15 с.

Центрифугируют 10 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 1 $см^3$ пробы в пустую пробирку. Полученный экстракт разбавляют моющим буфером PBS-буфером с твином (п. IV.1.6.4) в соотношении 1 : 2 (например: 0,1 $см^3$ нижней фазы + 0,1 $см^3$ моющего буфера).

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата (в пересчете на сухой продукт) учитывают фактор разбавления – 10.

IV.1.7.2. Подготовка проб мяса и субпродуктов скота и птицы

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

Навеску исследуемого продукта массой 5 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ моющего буфера и перемешивают на вортексе в течение в течение 10 с, затем перемешивают встряхиванием в течение 30 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Центрифугируют 10 мин при 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 **надосадочной фазы** переносят 1 $см^3$ пробы в пустую пробирку. Полученный экстракт разбавляют моющим буфером PBS-буфером с твином (п. IV.1.6.4) в соотношении 1 : 10 (например: 0,05 $см^3$ надосадочной фазы + 0,45 $см^3$ моющего буфера).

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата (в пересчете на сухой продукт) учитывают фактор разбавления – 50.

IV.1.7.3. Подготовка проб рыбы, продукции аквакультуры (рыба, креветки), кулинарных продуктов из рыбы с молочным компонентом для детского питания

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

Навеску исследуемого продукта массой 5 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ моющего буфера и перемешивают на вортексе в течение 10 с, затем перемешивают встряхиванием в течение 30 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Центрифугируют 10 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 **надосадочной фазы** переносят 1 $см^3$ пробы в пустую пробирку. Полученный экстракт разбавляют моющим буфером PBS-буфером с твином (п. IV.1.6.4) в соотношении 1 : 10 (например: 0,05 $см^3$ надосадочной фазы + 0,45 $см^3$ моющего буфера).

Полученный экстракт разбавляют моющим буфером PBS-буфером (п. IV.1.6.4) в соотношении 1 : 10 (например: 0,05 $см^3$ нижней фазы + 0,45 $см^3$ моющего буфера).

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата (в пересчете на сухой продукт) учитывают фактор разбавления – 50.

IV.1.7.4. Подготовка проб мёда

Навеску мёда массой 1 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, добавляют 9 $см^3$ экстракционного буфера (п. IV.1.6.8). Встряхивают до полного растворения меда.

Центрифугируют 10 мин при 3 000 g при комнатной температуре (20—25 °С), полученный прозрачный супернатант отбирают в пустую пробирку. Далее проводят очистку методом твердофазной экстракции с помощью колонок RIDA® C18 в соответствии со следующей процедурой.

Очистка раствора мёда методом твердофазной экстракции

При использовании колонок RIDA® C18 кондиционирование их проводят следующим образом: колонку промывают со скоростью потока 1 кап./с сначала пропуская 2 $см^3$ 100%-го метанола, а затем 2 $см^3$ дистиллированной воды, используя устройства для твердофазной экстрак-

ции (вакуумный манифолд) и руководствуясь инструкцией по его эксплуатации.

Примечание. При отсутствии устройства для твердофазной экстракции для создания давления воздуха на входе в колонку допускается использование пластикового шприца на 20 $см^3$ с резиновой пробкой, соединенного с колонкой через стеклянный буферный цилиндр и пластиковый переходник.

После кондиционирования на подготовленную колонку наносят 5 $см^3$ супернатанта и медленно продавливают через колонку со скоростью примерно 15 кап./мин.

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

Адсорбированные на колонке вещества осторожно, со скоростью 15 кап./мин, элюируют 1 $см^3$ 100%-го метанола в чистую пробирку. Элюирование пробы проводят медленно – со скоростью примерно 15 кап./мин.

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

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ PBS-буфера (п. IV.1.6.5) и тщательно перемешивают на вортексе, и затем разбавляют тем же буфером в соотношении 1 : 10 (например, 0,05 $см^3$ нижней фазы + 0,45 $см^3$ буфера).

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 40.

В случае использования колонок С18 *других производителей* рекомендуется придерживаться следующей процедуры. Осуществляют предварительное кондиционирование колонки путем последовательного промывания: метанолом, водно-метанольными смесями и водой со скоростью потока 1 кап./с по следующей схеме:

1) промывают колонку 2 $см^3$ метанола (100 %);

2) промывают колонку 0,5 $см^3$смеси метанол/дистиллированная вода (75/25, об./об.);

3) промывают колонку 0,5 $см^3$ смеси метанол/дистиллированная вода (50/50, об./об.);

4) промывают колонку 0,5 $см^3$ смеси метанол/дистиллированная вода (25/75, об./об.);

5) промывают колонку 2 $см^3$ дистиллированной воды.

Водные растворы метанола различной концентрации для кондиционирования колонок С18 должны быть приготовлены за 1 ч до использования. Для удаления воздушных пузырьков непосредственно перед использованием растворы перемешивают на вортексе.

Колонки, подготовленные таким образом, далее могут быть использованы аналогично колонкам RIDA®C18 (арт. R2002).

IV.1.7.5. Подготовка проб биологически активных добавок к пище на основе переработки молочного сырья (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %)

Методика описывает пробоподготовку для БАД к пище на основе молочного сырья, не включающих в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (соли йода, лизоцим и т. п.).

Экстракцию стрептомицина из исследуемых образцов БАД на основе переработки молочного сырья проводят следующим образом.

Всё количество представительной пробы БАД в форме таблеток, капсул, порошка полностью измельчают в гомогенизаторе или в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. БАД в виде сухого порошка тщательного перемешивают в блендере.

Далее готовят 10%-ю суспензию гомогенизированной пробы, для этого 1 г навески сухого продукта разводят в 9 $см^3$ дистиллированной воды, вновь тщательно перемешивают, встряхивают до полного растворения/суспендирования на вортексе в течение 1 мин и потом перемешивают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

После чего берут 1 $см^3$(г) подготовленной 10%-й суспензии и проводят экстракцию по п. IV.1.7.1.2, как с гомогенизированной пробой (при пересчете на сухой продукт дополнительно учитывают коэффициент разбавления – 10).

При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 100.

IV.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

IV.1.8.1. Общие положения

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.

2. 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.

IV.1.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

Подготовку тест-системы к исследованиям проводят следующим образом:

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

IV.1.8.3. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводят поэтапно:

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

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

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

4. По окончании инкубации выливают жидкость из лунок, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного интенсивного постукивания

рамки с лунками по столу (максимально выбивая капли из лунок), накрытому фильтровальной бумагой.

5. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер с твином по п. IV.1.6.4), 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.

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

6. 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 (20—25 °С) в течение 15 мин в темном месте.

7. По окончании инкубации добавляют в каждую лунку по 0,1 $см^3$ стоп-реагента. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и сразу после этого измеряют оптическую плотность в каждой лунке. Время от внесения стоп-реагента до измерения не должно превышать 15 мин.

IV.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

IV.1.9.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности содержимого лунок на планшетном фотометре (микропланшетном иммуноферментном анализаторе) при длине волны 450 нм. Оптическая плотность каждой лунки сравнивается с нулевым стандартом, значение которого принимается за 100 %.

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.

IV.1.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа с помощью тест-систем имеется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

Программное обеспечение выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B0 от натурального логарифма концентрации антибиотика:

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln X, \text{ где} \qquad (1)$$

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией антибиотика 0,00 нг/дм^3;

X – концентрация антибиотика в растворе, нг/дм^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \qquad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разведения пробы.

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

IV.1.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов стрептомицина (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

IV.1.9.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации стрептомицина в мкг/дм^3 строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

IV.1.9.5. Концентрацию стрептомицина (x) в мкг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

IV.1.9.6. Массовую концентрацию (содержание) антибиотика в мкг/кг в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 4.2;

K – коэффициент пересчета мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000.

При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Факторы разбавления для расчета содержания стрептомицина в пробах различных продуктов

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Молоко, сливки, молочные смеси (жидкие)	10
Молоко и молочные смеси с предварительным восстановлением (в пересчете на сухой продукт)	100
Сыр, творог, сливочное масло, спреды все виды	10
Мясо и субпродукты скота и птицы	50
Рыба, креветки, кулинарные продукты из рыбы с молочным компонентом для детского питания	50
Мёд	40
БАД к пище на основе переработки молочного сырья (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) (в сухом продукте)	100

IV.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

IV.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если содержание компонента выше предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 4.1), то результат анализа представляют в виде:

«*стрептомицин в молоке обнаружен*».

Если содержание компонента ниже предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 4.1), то результат анализа представляют в виде:

«*стрептомицин в молоке не обнаружен*».

IV.1.12. Подтверждение результатов полуколичественного определения

При обнаружении стрептомицина в исследуемых продуктах при исследовании полуколичественным методом на уровне МДУ и выше необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение IV
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы для определения стрептомицина
(на примере RIDASCREEN® Streptomycin арт. R3104)[8]

Тест-система для определения стрептомицина по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включающая следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

2. Комплект стандартных концентрированных растворов стрептомицина готовые к использованию со следующими концентрациями: 0; 0,5; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5 мкг/дм^3 в воде по 1,3 см^3 – 6 шт.

3. Конъюгат, готовый к использованию – 6 см^3.

4. Смесь субстрата с хромогеном содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин, готовая к использованию – 10 см^3.

5. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 14 см^3.

6. Моющий буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина (PBS-буфер с твином) – 1 пакет.

Наборы рассчитаны на проведение анализа в 2 повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

Специфичность методики определения стрептомицина, установленная по перекрестной чувствительности к исследованным антибиотикам в буферной системе, (на примере RIDASCREEN® Streptomycin арт. R3104), представлена ниже.

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

Специфичность к антибиотикам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

[8] Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

IV.2. Определение аминогликозидов (стрептомицин) методами подтверждающего анализа на основе ВЭЖХ-МС

IV.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания стрептомицина проводится в молоке и молочных продуктах, яйцах, яичном порошке, яичном меланже, мясе, мясных продуктах и продуктах из мяса птицы, меде, рыбе и в продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по ГОСТ 32798—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Аминогликозиды	Диапазон определяемых содержаний, мкг/кг
Гентамицин	20—80
Канамицин	40—160
Амикацин, гигромицин, спектиномицин	100—400
Дигидрострептомицин, стрептомицин	100—800
Неомицин, паромомицин	200—800
Апрамицин	400—1 600

IV.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотика на уровнях близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ 32798—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотика, обнаруженного методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ 32798—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной

хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержания антибиотика в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчет берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотика в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода определения равно или выше МДУ, необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотика проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотика проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотика в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствует антибиотик, определенный методом ИФА, дополнительного количества антибиотика. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времени удерживания пиков антибиотика пробы и антибиотика добавленного, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ 32798—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия аминогликозидов в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

IV.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотика в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженное вещество в составе образца совпадает как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со сравнительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандарта антибиотика;

б) соотношение сигнал/шум полученного пика определяемого антибиотика в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотика в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае невыполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

IV.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ 32798—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2016.23061.

– Свидетельство № 01.00225/205-09-16 от 17.03.2016.

Раздел V. Определение остаточных количеств пенициллинов в пищевой продукции животного происхождения

V.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств пенициллинов в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

V.1.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств стрептомицина методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) для следующих групп пищевых продуктов животного происхождения:

1. Молоко и молочные продукты

а) молоко, сливки (сырые, питьевые, сухие, концентрированные). Пределы обнаружения пенициллинов (по стандартному веществу): молоко – 0,0003 мг/дм^3; сливки – 0,001 мг/дм^3;

б) продукты переработки молока (молочные смеси, в том числе для детского питания, сгущенное и концентрированное молоко, масло из коровьего молока, спреды сливочно-растительные, сыр, продукты кисломолочные: напитки на основе сыворотки (без добавок/с фруктами), сметана, творог, йогурт, кефир). Пределы обнаружения пенициллинов (по стандартному веществу): детское питание (восстановленное) – 0,0003 мг/кг; масло из коровьего молока, спреды сливочно-растительные и сыр – 0,002 мг/кг; сгущенное и концентрированное молоко, напитки на основе сыворотки – 0,001 мг/дм^3; напитки на основе сыворотки фруктовые – 0,001 мг/дм^3; творог и сметана – 0,0025 мг/кг; йогурт (без добавок/фруктовый) и кефир – 0,003 мг/кг.

2. Мясо и мясопродукты, в том числе птицы

Мясо и субпродукты скота и птицы. Пределы обнаружения пенициллинов (по стандартному веществу) примерно: 0,0025 мг/кг.

3. Рыба и рыбная продукция, продукция аквакультуры

а) рыба и рыбная продукция, продукция аквакультуры (рыба, креветки) сырая. Пределы обнаружения пенициллинов (по стандартному веществу) примерно: рыба– 0,0025 мг/кг, креветки – 0,003 мг/кг;

б) кулинарные продукты из рыбы с молочным компонентом для детского питания. Пределы обнаружения пенициллинов (по стандартному веществу) примерно: 0,0025 мг/кг.

4. Масло-жировая продукция (спреды растительно-сливочные)

Пределы обнаружения пенициллинов (по стандартному веществу) примерно: 0,002 мг/кг.

5. Биологически активные добавки к пище на основе переработки молочного сырья, не включающие в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (соли йода, лизоцим и т. п.) (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %). Пределы определения пенициллинов (по стандартному веществу), мг/кг: 0,003 (в пересчете на сухой продукт).

V.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

В основе принципа действия тест-системы лежит реакция «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты антителами захвата к антителам на ампициллин. В лунки дозируют растворы стандартов или проб, антитела к ампициллину и конъюгат ампициллина. Свободный ампициллин и ампициллин из ферментного конъюгата конкурируют за места связывания антител (конкурентный иммуноферментный анализ). Антитела к ампициллину связываются иммобилизированными антителами захвата. Все несвязанные молекулы конъюгата удаляются на этапе отмывки. В лунки вносят раствор субстрат/хромогена и инкубируют. Связанные молекулы конъюгата преобразуют хромоген в окрашенные в синий продукты реакции. Внесение стоп-раствора ведет к изменению окраски от синего к желтому. Измерение выполняют фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации ампициллина в пробе.

V.1.3. Пределы полуколичественного метода определения

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств стрептомицина в пищевых продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа представлены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Пределы полуколичественного метода определения остаточных количеств пенициллинов в пищевых продуктах методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения*, мг/кг (мг/дм^3)	Среднее значение открываемости (степень извлечения по стандартному веществу), %
1	2	3
Молоко (сырое, питьевое), молоко восстановленное, молочные смеси, в том числе для детского питания восстановленные (при коэффициенте восстановления – 10)	0,0003	81,4

Продолжение табл. 5.1

1	2	3
Сгущенное и концентрированное молоко, сливки, напитки на основе сыворотки	0,001	127
Напитки на основе сыворотки (фруктовые)	0,001	152
Йогурт (без добавок/фруктовый), кефир	0,003	87
Творог, сметана	0,0025	101
Сыр, сливочное масло, спреды все виды	0,002	115
Мясо и субпродукты скота и птицы	0,0025	112
Рыба и рыбная продукция, продукция аквакультуры (рыба), кулинарные продукты из рыбы с молочным компонентом для детского питания	0,0025	124
Креветки	0,003	80
БАД к пище на основе переработки молочного сырья (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) (в сухом продукте)	0,003	80
* В отношении пенициллинов, к которым определена чувствительность		

V.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы при полуколичественном методе определения

V.1.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 $см^3$ и от 0,1 до 5 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы многоканальные с переменным объемом 0,03—0,3 $см^3$ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г

Фотометр вертикального типа – планшетный иммуноферментный анализатор с диапазоном

линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и длиной волны 450 нм	
Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА	
pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01, не более	
Цилиндры мерные, стаканы химические вместимостью 25, 50, 100 см^3	ГОСТ 1770—74
Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2 вместимостью 50 и 100 см^3	ГОСТ 1770—74
Пипетки (с делениями) 2-го класса точности объемом 1, 2, 5 и 10 см^3	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81)

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

V.1.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (60 ± 1) °C	
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов, или фарфоровые ступки с пестиками)	
Конические колбы на 50 и 100 см^3	ГОСТ 23932—90
Магнитная мешалка	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 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 типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 см^3	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением	

(ОЦУ/RFS)[9] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[9] до 20 000 g
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин
Шкаф (стол) лабораторный

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

V.1.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Натрия гидроокись (NaOH), хч	ГОСТ 4328

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

V.1.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением V (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

V.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-наборов.

---

[9] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;

– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

V.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения

V.1.6.1. 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.

V.1.6.2. Подготовка оборудования

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

V.1.6.3. Хранение и использование наборов и реагентов

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

V.1.6.4. Приготовление буфера для разбавления

Разбавить **концентрат буфера для разбавления** стандартных растворов, конъюгата, антител, проб, имеющийся в комплекте, в соотношении 1 : 4 (1 + 3) деминерализованной водой (например, 10 $см^3$ концентрата + 30 $см^3$ деминерализованной воды). Разбавленный буфер для разбавления стандартов, проб, антител и конъюгата может храниться при 2—8 °С до истечения срока годности, указанного на концентрате.

V.1.6.5. Приготовление моющего буфера

Разбавить **концентрат моющего буфера** в соотношении 1 : 20 (1 + 19) деминерализованной водой (например, 2 $см^3$ концентрата + 38 $см^3$ деминерализованной воды, достаточно для 4 микротитровальных стрипов, т. е. 32 лунок). Разбавленный буфер может храниться при 2—8 °С до конца срока годности, указанного на концентрате.

V.1.6.6. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия

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

V.1.6.7. Приготовление раствора для экстракции пенициллинов

В колбу вместимостью 25 $см^3$ приливают 9,4 $см^3$ метанола, 9,4 $см^3$ ацетонитрила и 6,2 $см^3$ буферного раствора для разбавления проб (п. V.1.6.4). Раствор тщательно перемешивают.

V.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

V.1.7.1. Подготовка проб молока (сырое, питьевое, сухое, обезжиренное, цельное), сухого молока, молочных смесей, в том числе для детского питания

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (в нормативно-технической документации на продукт). Пробы нейтрализуют с помощью 0,5 М раствора гидроокиси натрия (п. V.1.6.6), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

V.1.7.1.1. *Молоко и молочные продукты с содержанием жира ≤ 1,5 %*

Пробу исследуемого продукта перемешивают на вортексе в течение 3 с, разбавляют в соотношении 1 : 2 (1 + 1) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 1 $см^3$ молока + 1 $см^3$ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 2, для сухих продуктов дополнительно учитывают коэффициент восстановления.

V.1.7.1.2. *Молоко и молочные продукты с содержанием жира > 1,5 %*

Пробу исследуемого продукта центрифугируют в течение 5 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).

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

Обезжиренный супернатант разбавляют в соотношении 1 : 2 (1 + 1) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 1 $см^3$ молока + 1 $см^3$ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 2, для сухих продуктов дополнительно учитывают коэффициент восстановления.

V.1.7.1.3. *Сухое молоко, молочные смеси, в том числе для детского питания*

Навеску исследуемого сухого продукта массой 1 г разводят в деминерализованной воде до объема 10 $см^3$ и перемешивают на вортексе до полного растворения.

Пробу исследуемого продукта центрифугируют в течение 5 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).

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

Обезжиренный супернатант разбавляют в соотношении 1 : 2 (1 + 1) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 1 $см^3$ восстановленного детского питания + 1 $см^3$ буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата (в пересчете на сухой продукт) учитывают фактор разбавления – 20.

V.1.7.2. Подготовка проб молочных продуктов

V.1.7.2.1. *Сгущенное и концентрированное молоко, напитки на основе сыворотки (без добавок/с фруктами)*

Пробу исследуемого продукта разбавляют в соотношении 1 : 10 (1 + 9) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 0,2 см^3 пробы + ,8 см^3 буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе в течение 3 с.

Далее используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10.

V.1.7.2.2. *Сливки, кисломолочные продукты: творог, сметана, йогурт (без наполнителя/фруктовый), кефир*

К пробе исследуемого продукта массой 5 г добавляют 20 см^3 деминерализованной воды, гомогенизируют на вортексе и центрифугируют 10 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).

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

Обезжиренный супернатант разбавляют 1 : 4 (1 + 3) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 0,5 см^3 нижней водной фазы + 1,5 см^3 буфера для разбавления проб).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 20.

V.1.7.2.3. *Сливочное масло, спреды сливочно-растительные*

Навеску исследуемого продукта массой 5,0 г вносят в центрифужную пробирку объёмом 50 см^3, приливают 20 см^3 деминерализованной воды и инкубируют при 40 °С на водяной бане до полного расплавления, после чего гомогенизируют с помощью вортекса.

Центрифугируют 10 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).

Образовавшийся верхний слой жира удаляют с помощью шпателя или стеклянной палочки, **нижнюю фазу** отбирают в пустую пробирку.

Нижнюю фазу разбавляют в соотношении 1 : 4 (1 + 3) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 0,5 см^3 нижней водной фазы + 1,5 см^3 буфера для разбавления проб).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 20.

V.1.7.2.4. *Твердые и мягкие сыры*

С поверхности образца сыра удаляют плесневый налет (при наличии).

Навеску исследуемого продукта массой 5 г вносят в центрифужную пробирку объёмом 50 см^3, приливают 20 см^3 деминерализованной воды и тщательно гомогенизируют в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Центрифугируют 10 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).

Образовавшийся верхний слой жира удаляют с помощью шпателя или стеклянной палочки, **надосадочную фазу** отбирают в пустую пробирку.

Надосадочную фазу разбавляют в соотношении 1 : 4 (1 + 3) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 0,5 см^3 нижней водной фазы + 1,5 см^3 буфера для разбавления проб).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 20.

V.1.7.3. Подготовка проб мяса и субпродуктов скота и птицы

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

Навеску гомогенизированной пробы массой 1 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3, прибавляют 4 см^3 деминерализованной воды, тщательно перемешивают на вортексе, а затем перемешивают встряхиванием в течение 15 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).

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

Надосадочную фазу разбавляют в соотношении 1 : 4 (1 + 3) буфером для разбавления проб (п. V.1.6.4) (например, 0,05 см^3 пробы + 0,15 см^3 буфера для разбавления проб).

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 20.

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

V.1.7.4. Подготовка проб рыбы и рыбной продукции, продукции аквакультуры (рыба, креветки) (сырой, охлажденной, мороженной, варёно-мороженной), кулинарных продуктов из рыбы с молочным компонентом для детского питания

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

Экстракцию проводят по п. V.1.7.3.

Для анализа используют 0,05 см^3 подготовленной пробы на лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 40.

V.1.7.5. Подготовка проб спредов растительно-сливочных

Пробоподготовку (экстракцию) проводят по п. V.1.7.2.3 (Сливочное масло, спреды сливочно-растительные).

V.1.7.6. Подготовка проб биологически активных добавок к пище на основе переработки молочного сырья (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %)

Методика описывает пробоподготовку для БАД к пище на основе молочного сырья, не включающих в рецептуру веществ и соединений с антимикробными свойствами (соли йода, лизоцим и т. п.).

Экстракцию пенициллинов из исследуемых образцов БАД на основе переработки молочного сырья проводят следующим образом.

Всё количество представительной пробы БАД в форме таблеток, капсул, порошка полностью измельчают в гомогенизаторе или в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. БАД в виде сухого порошка тщательного перемешивают в блендере.

Далее готовят 10%-ю суспензию гомогенизированной пробы, для этого 1 г навески сухого продукта разводят в 9 см^3 дистиллированной воды, вновь тщательно перемешивают, встряхивают до полного растворения/суспендирования на вортексе в течение 1 мин и потом перемеши-

вают в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

После чего берут 1 г ($см^3$) подготовленной 10%-й суспензии и проводят экстракцию по п. V.1.7.1, как с гомогенизированой пробой (при пересчёте на сухой продукт дополнительно учитывают коэффициент разведения – 10).

При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 20.

V.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

V.1.8.1. Общие положения

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.

2. 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.

V.1.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

Подготовку тест-системы к исследованиям проводят следующим образом:

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

V.1.8.3. Подготовка реагентов к исследованиям

V.1.8.3.1. **Антитела к ампициллину** поставляются в концентрированном виде. Так как разбавленный раствор антител обладает ограниченной стабильностью, перед исследованием необходимо восстанавливать строго то количество антител, которое необходимо для анализа.

Пробирку с антителами центрифугируют в течение краткого периода времени – 1 мин при 1 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). Для восстановления разбавляют концентрат в соотношении 1 : 100 (1 + 99) буфером для разбавления антител (п. V.1.6.4) (например, 0,010 $см^3$ концентрата антител + 0,99 $см^3$ буфера для разбавления антител, такого количества достаточно для 4 стрипов, т. е. 32 лунок).

V.1.8.3.2. **Ферментный конъюгат ампициллина** поставляется в концентрированном виде. Так как разбавленный раствор конъюгата обладает ограниченной стабильностью, то перед исследованием необходимо восстанавливать строго то количество антител, которое необходимо для анализа.

Пробирку с конъюгатом центрифугируют в течение краткого периода времени – 1 мин при 1 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). Для восстановления разбавить концентрат в соотношении 1 : 100 (1 + 99) буфером для разбавления антител (п. V.1.6.4) (например, 0,010 $см^3$ концентрата антител + 0,99 $см^3$ буфера для разбавления конъюгата, достаточно на 4 стрипа, т. е. 32 лунок).

V.1.8.3.3. **Стандарт ампициллина** поставляется в виде лиофилизата. Для восстановления лиофилизата необходимо в 1 флакон со стандартом добавить 2 $см^3$ готового буфера для разбавления стандартов (п. V.1.6.4), при этом получится стандарт 7 с концентрацией пенициллина 4 $нг/см^3$ (или 0,004 $мкг/см^3$). Далее готовят стандарты 2—6, выполнив серию разбавлений по приведенной схеме:

Стандарт, восстановленный в 2 $см^3$ буфера для разбавления стандартов		≥	стандарт 7 = 4 $нг/см^3$
0,25 $см^3$ стандарта 7	+ 0,25 $см^3$ буфера для разбавления стандартов	≥	стандарт 6 = 2 $нг/см^3$
0,25 $см^3$ стандарта 6	+ 0,25 $см^3$ буфера для разбавления стандартов	≥	стандарт 5 = 1 $нг/см^3$
0,25 $см^3$ стандарта 5	+ 0,25 $см^3$ буфера для разбавления стандартов	≥	стандарт 4 = 0,5 $нг/см^3$
0,25 $см^3$ стандарта 4	+ 0,25 $см^3$ буфера для разбавления стандартов	≥	стандарт 3 = 0,25 $нг/см^3$
0,25 $см^3$ стандарта 3	+ 0,25 $см^3$ буфера для разбавления стандартов	≥	стандарт 2 = 0,125 $нг/см^3$

Буфер для разбавления стандартов (п. V.1.6.4) используется как стандарт 1 = 0 нг/см^3.

Для экономичного расходования приготовленных стандартов допускается разделить стандарты на аликвоты и заморозить их при –20 °С, в таком виде их можно хранить до 1 недели. Не допускается повторное замораживание – оттаивание стандартов.

V.1.8.4. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводят поэтапно.

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

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

3. Затем в каждую лунку добавляют по 0,025 см^3 разбавленного ферментного конъюгата (п. V.1.8.3.2).

4. Далее в каждую лунку добавляют по 0,025 см^3 разбавленного раствора антител (п. V.1.8.3.1). Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при температуре (4 ± 2) °С (в холодильнике) в течение 1 часа в темном месте.

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

6. Заполняют лунки моющим буфером (п. V.1.6.5), внося по 0,3 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.

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

7. 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 (20—25 °С) в течение 30 минут в темном месте.

8. По окончании инкубации добавляют в каждую лунку по 0,1 см^3 стоп-реагента. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, немедленно измеряют оптическую плотность в каждой лунке.

V.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

V.1.9.1. 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 ($A_{450нм} < 0,8$) 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.

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

V.1.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа используется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln X, \text{ где} \qquad (1)$$

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

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

X – концентрация антибиотика в растворе, мкг/дм^3 (нг/см^3).

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \qquad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы.

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

V.1.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов пенициллина (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

V.1.9.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим им значениям концентрации пенициллина в мкг/дм^3, строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

V.1.9.5. Концентрацию пенициллина (x) в мкг/дм^3 (нг/см^3) считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

V.1.9.6. Массовую концентрацию (содержание) пенициллина в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 5.2;

K – коэффициент пересчета мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000.

Таблица 5.2

Факторы разбавления для расчета содержания пенициллинов в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Молоко, жидкие молочные продукты	2
Сухое молоко, молочные смеси, детское питание в пересчете на сухой продукт	20
Детское питание восстановленное (при коэффициенте восстановления – 10)	2
Сгущенное и концентрированное молоко, сливки напитки на основе сыворотки (с фруктами)	10
Йогурт (без добавок/фруктовый), кефир, пахта, сливки,	20
Творог, сметана	20
Сливочное масло, спреды все виды	20
Сыр	20
Мясо и субпродукты скота и птицы	20
Рыба и рыбная продукция, продукция аквакультуры (рыба, креветки), кулинарные продукты из рыбы с молочным компонентом для детского питания	20
БАД к пище на основе переработки молочного сырья (с содержанием молочных ингредиентов более 90 %) (в сухом продукте)	20

V.1.10. Расчет результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

V.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если содержание компонента выше предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 5.1), то результат анализа представляют в виде:

«*пенициллины в молоке обнаружены*».

Если содержание компонента ниже предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 5.1), то результат анализа представляют в виде:

«*пенициллины в молоке не обнаружены*».

V.1.12. Подтверждение результата полуколичественного метода определения

При обнаружении пенициллина в исследованных образцах пищевых продуктов полуколичественным методом анализа на уровне МДУ и выше необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение V
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы для определения пенициллинов
(на примере Penicillin ELISA, арт. 5091PEN)[10]

Набор для определения пенициллина по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Стандарт в лиофилизированном виде 0,004 мкг/см^3 – 3 шт.
3. Конъюгат, концентрат (×100) – 0,1 см^3.
4. Антитела, концентрат (×100) – 0,1 см^3.
5. Субстрат/хромоген – 12 см^3.
6. Готовая смесь субстрата с хромогеном содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин – 12 см^3.
7. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 15 см^3.
8. Буфер для разбавления стандартных растворов, конъюгата, антител, образцов, концентрат (×4) – 25 см^3.
9. Моющий буфер, концентрат (×20) – 30 см^3.

Набор рассчитан на проведение анализа в 2 повторностях 41 исследуемого образца и 7 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

Специфичность методики определения пенициллина, установленная по перекрестной чувствительности к исследованным антибиотикам в буферной системе (на примере Penicillin ELISA, арт. 5091PEN), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
Ампициллин (вещество стандарта)	100
Пенициллин G	100
Азлоциллин	99
Пиперациллин	88
Амоксициллин	85
Пенициллин V	58
Оксациллин	40
Клоксациллин	30
Диклоксациллин	15
Нафциллин	3
Цефалоспориновые антибиотики	< 1

Специфичность к антибиотикам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

[10] Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

V.2. Определение пенициллинов методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС)

V.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания пенициллинов проводится в молоке и молочных продуктах, яйцах и яичных продуктах, мясе, мясных продуктах и продуктах из мяса птицы, мёде, рыбе и морепродуктах и в продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 1,0—1 000,0 мкг/кг.

V.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотиков на уровнях близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотиков, обнаруженных методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего следующие:

1. Обнаружение содержаний антибиотиков в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом

в расчет берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотиков в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода определения равно или выше МДУ, необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотиков проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотиков проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотиков в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствуют антибиотики, определенные методом ИФА, дополнительного количества антибиотиков. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времен удерживания пиков антибиотиков пробы и антибиотиков добавки, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия пенициллинов в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

V.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотиков в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженные вещества в составе образца совпадают как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со сравнительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандартов антибиотиков;

б) соотношение сигнал/шум полученных пиков определяемых антибиотиков в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотиков в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае невыполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

V.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2011.09610.

– Свидетельство № 01.00225/205-8-11 от 10.02.2011.

Раздел VI. Определения остаточных количеств хинолонов (фторхинолонов) в пищевой продукции животного происхождения

VI.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств хинолонов (фторхинолонов) в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

VI.1.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств хинолонов (фторхинолонов) методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) для пищевых продуктов животного происхождения, в том числе для яиц, яйцепродуктов, мяса и субпродуктов, птицы, рыбы и креветок, молока (сырого, свежего, пастеризованного, обезжиренного, цельного, сухого).

Пределы обнаружения антибиотиков хинолонов и фторхинолонов (по стандартному веществу), мг/кг (мг/дм^3): мясо, субпродукты – 0,010; рыба – 0,008; креветки – 0,006; яйца – 0,009; яйцепродукты сухие (яичный меланж, яичный порошок) – 0,09; молоко – 0,0005; молоко сухое – 0,005; мёд – 0,003.

VI.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

В основе принципа действия тест-системы лежит реакция «антиген – антитело». Лунки микротитровального планшета покрыты антителами захвата к антителам на хинолоны. В лунки вносят растворы стандартов или проб, ферментный конъюгат ципрофлоксацина и антитела к хинолонам. Свободные хинолоны и ципрофлоксацин из конъюгата конкурируют за места связывания с антителами к хинолонам (конкурентный иммуноферментный анализ). В то же время антитела к хинолонам связываются иммобилизированными антителами захвата. Все несвязанные молекулы конъюгата затем удаляются на этапе отмывки. В лунки вносится раствор субстрат/хромогена, выполняется инкубация. Связанный конъюгат преобразует хромоген в окрашенные в синий продукты реакции. Измерение выполняют фотометрически при 450 нм; оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации хинолонов в пробе.

VI.1.3. Пределы полуколичественного метода определения

Пределы полуколичественного метода определения остаточных количеств хинолонов в пищевых продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа представлены в табл. 6.1.

Таблица 6.1

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств хинолонов в пищевых продуктах методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения*, мг/кг (мг/дм^3)	Среднее значение открываемости (степень извлечения по стандартному веществу), %
Молоко (сырое, питьевое)	0,0005	111
Молоко (сухое), сгущенное и концентрированное (в пересчёте на исходный продукт)	0,005	111
Мясо и субпродукты, в том числе птицы	0,01	117
Рыба и аквакультура (сырая, охлажденная, мороженная, варено-мороженная)	0,008	89
Креветки	0,006	94
Яйца (сырые)	0,009	94
Яйцепродукты сухие (яичный порошок, меланж, яичный белок)	0,09	86
Мёд	0,003	105
* В отношении хинолонов, к которым определена чувствительность		

VI.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

VI.1.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 см^3 и от 0,1 до 1 см^3 с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы многоканальные с переменным объемом 0,03—0,3 см^3 с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г	
Фотометр вертикального типа фотометрирования (микропланшетный иммуноферментный анализатор) с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и светофильтром на 450 нм	
Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА	
pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01, не более	
Цилиндры мерные, стаканы химические вместимостью 25, 50, 100, 200, 250, 500 $см^3$	
Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2, вместимостью 50 и 100 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пипетки (с делениями) 2-го класса точности объемом 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81)

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

VI.1.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026
Вакуумная установка (манифолд) для твердофазной экстракции с использованием колонок для твердофазной экстракции (на примере колонок RIDA № C18) (или набор приспособлений (цилиндры, адаптеры, шприцы с пробками), (на примере набора, арт. RBRAP01)	
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Измельчитель-гомогенизатор или фарфоровые ступки с пестиками	
Конические колбы на 50 и 100 $см^3$ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932—90
Магнитная мешалка	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 $см^3$ однократного применения	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 $см^3$	

Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 $см^3$	
Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 $см^3$	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[11] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[11] до 20 000 g	
Цилиндры 1(2,3)-100(250)-1	ГОСТ 1770
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин	
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин	
Шкаф (стол) лабораторный	
Колонки для твердофазной экстракции (например, RIDA® C18 (арт. R2002)	
Устройство для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд) или пластиковый шприц на 20 $см^3$ с резиновой пробкой (для экстракции проб мёда)	

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

VI.1.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
н-Гексан с содержанием основного вещества не менее 99,85 %, для ВЭЖХ	
Гептансульфоновой кислоты натриевая соль для ВЭЖХ	
Метанол, хч	ГОСТ 6995

[11] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

Натрий фосфорнокислый трехзамещенный 12-водный (трисодиумфосфат) ($Na_3PO_4 \times 12H_2O$), чда

Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), хч ГОСТ 4172—76

Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$), хч ГОСТ 245—76

Ортофосфорная кислота (H_3PO_4) 85%-я, чда

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

VI.1.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением VI (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

VI.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-наборов.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:
– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;
– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

VI.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения

VI.1.6.1. 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.

VI.1.6.2. Подготовка оборудования

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

VI.1.6.3. Хранение и использование наборов и реагентов

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

VI.1.6.4. 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. Используют пакет с солью для приготовления моющего буфера, входящий в комплект набора. Растворяют содержимое целого пакетика в 1 $дм^3$ дистиллированной воды. Готовый 10 мМ моющий буфер может храниться при температуре 2—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 (20—25 °С).

Для приготовления готового к употреблению 10 мМ моющего буфера растворяют одну часть 10-кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

VI.1.6.5. Раствор метанола 70%-й

Для приготовления 70%-го раствора метанола вносят 70 $см^3$ чистого метанола в мерную колбу объемом 100 $см^3$, добавляют 30 $см^3$ дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

VI.1.6.6. Раствор метанола 35%-й

Для приготовления 35%-го раствора метанола вносят 35 см^3 чистого метанола в мерную колбу объемом 100 см^3, добавляют 65 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают, либо разбавляют готовый 70%-й раствор метанола дистиллированной водой в 2 раза.

VI.1.6.7. Экстрагирующий буфер для креветок

Раствор метанола 70%-й (п. VI.1.6.5) разбавляют готовым моющим буфером (п. VI.1.6.4) в соотношении 1 : 2 (например, 1 часть раствора метанола + 1 часть готового моющего буфера).

VI.1.6.8. Приготовление экстрагирующего буфера (раствор 50 мМ натриевой соли гептансульфоновой кислоты с 25 мМ тринатрийфосфатом, pH 2,0)

Навески 2,0 г натриевой соли гептансульфоновой кислоты и 1,9 г трисодиумфосфата растворить в 170—190 см^3 дистиллированной воды, установить pH ортофосфорной кислотой до 2,0 ± 0,1 и довести до конечного объема – до 200 см^3.

VI.1.6.9. 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 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.

VI.1.6.10. 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.

VI.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

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

в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

VI.1.7.1. Подготовка проб молока (сырого, свежего, пастеризованного, обезжиренного, цельного, сухого)

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (в нормативно-технической документации на продукт). При отсутствии информации: 1 г сухого продукта суспендируют в 9 $см^3$ дистиллированной воды.

Молоко центрифугируют в течение 15 мин при 1 000 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).

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 используют 0,05 $см^3$ подготовленной пробы на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1, для сухих продуктов дополнительно учитывают коэффициент восстановления – 10.

VI.1.7.2. Подготовка проб мяса и субпродуктов, в том числе птицы

Все количество представительной пробы гомогенизируют вручную в фарфоровой ступке или в гомогенизаторе.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1,0 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, прибавляют 4 $см^3$ 70%-го раствора метанола (п. VI.1.6.5) и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, переворачивая пробирку вверх–вниз или используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом), или перемешивают на вортексе.

Центрифугируют 10 мин при 4 000 g при комнатной температуре (20—25°С). Супернатант 1 $см^3$ переносят в чистую пробирку и добавляют 1 $см^3$ моющего буфера (п. VI.1.6.4), после чего перемешивают на вортексе 10 с.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного таким образом экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10.

VI.1.7.3. Подготовка проб рыбы и рыбной продукции, продукции аквакультуры (рыба, креветки) (сырой, охлажденной, мороженной, варено-мороженной)

VI.1.7.3.1. *Рыба*, экстракцию проводят по п. VI.1.7.2.

VI.1.7.3.2. *Креветки*

Все количество представительной пробы гомогенизируют вручную в фарфоровой ступке или в гомогенизаторе.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1,0 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, прибавляют 4 $см^3$ экстрагирующего буфера для креветок (по п. VI.1.6.7) и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, переворачивая пробирку вверх–вниз или используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом), или перемешивают на вортексе.

Центрифугируют 10 мин при 4 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). Супернатант в количестве 1 $см^3$ переносят в чистую пробирку.

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

VI.1.7.4. Подготовка проб яиц (сырых) и яйцепродуктов сухих (яичный порошок, меланж, яичный белок)

VI.1.7.4.1. *Яйца (сырые)*

Отделяют содержимое яиц от скорлупы (все количество представительной пробы) и перемешивают на гомогенизаторе.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1,0 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$, прибавляют 9 $см^3$ 35%-го раствора метанола (п. VI.1.6.6) и перемешивают встряхиванием в течение 10 мин, переворачивая пробирку вверх–вниз или используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом), или перемешивают на вортексе.

Центрифугируют 10 мин при 4 000 g при комнатной температуре (20—25 °С). Супернатант в количестве 1 $см^3$ переносят в чистую пробирку.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного таким образом экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 10.

VI.1.7.4.2. *Яйцепродукты сухие (яичный порошок, меланж, яичный белок)*

Из сухого порошка готовят 10%-ю суспензию, для этого 1,0 г сухого продукта разводят в 9 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

Далее проводят экстракцию по п. VI.1.7.4.1.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного таким образом экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 100.

VI.1.7.5. Подготовка проб мёда

Навеску мёда гомогенизированную в количестве 4,5 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$ и встряхивают с 25,5 $см^3$ экстракционного буфера, pH 2,0 (п. VI.1.6.8) в течение 10 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом) до полного растворения.

Центрифугируют полученную смесь при температуре 20—25 °С в течение 5 мин при 1 000 g, переносят супернатант в чистую центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$.

К 15 $см^3$ супернатанта добавляют 8 $см^3$ н-гексана, встряхивают 5 мин, используя встряхиватель с вертикальным вращением (переворотом).

Центрифугируют полученную смесь при температуре 20—25 °С в течение 3 мин при 1 000 g, **нижнюю фазу** переносят в чистую центрифужную пробирку. Если нижняя фаза остаётся мутной, то повторяют процедуру центрифугирования: 3 мин при 1 000 g при комнатной температуре для получения **прозрачной фракции** раствора мёда.

Прозрачную фракцию очищают методом твердофазной экстракции с помощью колонок RIDA® C18 в соответствии с нижеуказанной процедурой.

Очистка раствора мёда методом твердофазной экстракции

Колонку для твердофазной экстракции промывают 2 $см^3$ 100%-го метанола со скоростью 1 кап./с, используя устройство для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд) и руководствуясь инструкцией по его эксплуатации.

Примечание. При отсутствии устройства для твердофазной экстракции для создания давления воздуха на входе в колонку допускается использование пластикового шприца на 20 $см^3$ с резиновой пробкой, соединенного с колонкой через стеклянный буферный цилиндр и пластиковый переходник.

Весь объём подготовленного раствора исследуемой пробы (примерно 10 $см^3$) пропускают через колонку со скоростью 15 кап./мин.

Затем колонку промывают 3 $см^3$ 20%-го раствора метанола в воде со скоростью 1 кап./с, удаляют остатки жидкости, после чего высушивают колонку в токе воздуха или азота.

Устанавливают под колонку чистую пробирку. Вносят на колонку 0,5 $см^3$ 100%-го метанола и осторожно, со скоростью 15 кап./мин, элюируют адсорбированный аналит (хинолоны) в чистую пробирку, остатки жидкости выдавливают в ту же пробирку.

К 0,5 см^3 элюата добавляют 1 см^3 20 мМ фосфатного буфера (п. VI.1.6.9).

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

Примечание. При необходимости для дальнейшего разбавления растворов используют раствор метанола в фосфатном буфере (35 см^3 метанола и 65 см^3 20 мМ фосфатного буфера п. VI.1.6.9).

VI.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

VI.1.8.1. Общие положения

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.

2. 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.

VI.1.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

Подготовку тест-системы к исследованиям проводят следующим образом:

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 2—8 °С.

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

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

VI.1.8.3. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводят поэтапно:

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

2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 $см^3$ каждой концентрации раствора стандарта, раствора подготовленной пробы продукта. Для каждого раствора необходимо использовать новые наконечники.

3. Добавляют в лунки по 0,05 $см^3$ ферментного конъюгата.

4. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 $см^3$ раствора антител. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации в холодильнике при 2—8 °С в течение 1 ч.

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

6. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер с твином по п. VI.1.6.4), внося по 0,25 $см^3$ в каждую лунку, используя восьмиканальный дозатор. После контакта выливают буфер для промывки из лунок, тщательно выбивают капельки жидкости путем троекратного интенсивного постукивания рамки с лунками по столу (максимально выбивая капли из лунок), накрытому фильтровальной бумагой. Процедура отмывки повторяется трижды.

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

7. После отмывания добавляют по 0,1 $см^3$ субстрата/хромогена в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 15 мин в темном месте.

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

VI.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

VI.1.9.1. Инструментальный учёт реакции проводят путем измерения оптической плотности содержимого лунок на микропланшетном иммуноферментном анализаторе (планшетный фотометр, ридер) при длине волны 450 нм. Оптическая плотность каждой лунки сравнивается с нулевым стандартом, значение которого принимается за 100 %.

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.

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

VI.1.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа используется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

$$B/B_0 = a + b \cdot \ln X, \text{ где} \qquad (1)$$

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

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

X – концентрация антибиотика в растворе, мкг/дм^3.

Расчёт коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \qquad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разведения пробы.

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

VI.1.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов антибиотика (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

VI.1.9.4. 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.

VI.1.9.5. Концентрацию хинолонов (x) в мкг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

VI.1.9.6. Массовую концентрацию (содержание) хинолонов в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 6.2;

K – коэффициент пересчёта мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000.

Таблица 6.2

Факторы разбавления для расчёта содержания хинолонов в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Мясо и субпродукты, в том числе птицы	10
Рыба	10
Яйца и яичные продукты (сырые, жидкие)	10
Яйцепродукты сухие (яичный порошок, меланж, яичный белок)	100
Креветки	5
Молоко (сырое, свежее, пастеризованное, обезжиренное, цельное)	1
Молоко сухое	10
Мёд	1

VI.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

VI.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если содержание компонента выше предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 6.1), то результат анализа представляют в виде:

«*хинолоны в молоке обнаружены*».

Если содержание компонента ниже предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 6.1), то результат анализа представляют в виде:

«*хинолоны в молоке не обнаружены*».

VI.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения

При обнаружении хинолонов в исследованных образцах пищевых продуктов полуколичественным методом анализа на уровне МДУ и выше необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение VI
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы для определения хинолонов
(на примере RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones, арт. R3113)[12]

Набор для определения хинолонов по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.

2. Комплект стандартных концентрированных растворов 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.

3. Конъюгат с ципрофлоксацином, готовый к употреблению – 10 см^3.

4. Антитела к хинолонам – 6 см^3.

5. Готовая смесь субстрата с хромогеном содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин – 10 см^3.

6. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 14 см^3.

7. Моющий буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина – 1 пакет.

Наборы рассчитаны на проведение анализа в 2 повторностях 42 исследуемых образцов и 6 калибровочных проб (всего 96 определений на один планшет).

Специфичность методики определения хинолонов, установленная по перекрестной чувствительности к исследованным антибиотикам в буферной системе (на примере, RIDASCREEN® Chinolone/Quinolones, арт. R3113), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
Ципрофлоксацин	100
Норфлоксацин	100
энрофлоксацин	100
марбофлоксацин	100
данофлоксацин	100
дифлоксацин	100
флюмеквин	100
офлоксацин	100
Сарафлоксацин	43
Оксолиновая кислота	24

Специфичность к антибиотикам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

[12] Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

VI.2. Определение хинолонов (фторхинолонов) методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.)

VI.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания хинолонов проводится в мясе, мясных продуктах и продуктах из мяса птицы, яйцах, яичном порошке, яичном меланже, молоке, мёде, рыбе и в продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по ГОСТ 32797—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 1—2 000 мкг/кг.

VI.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотиков на уровнях, близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ 32797—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотиков, обнаруженных методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ 32797—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержаний антибиотиков в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчет берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотиков в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода определения равно

или выше МДУ, необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотиков проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотиков проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотиков в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствуют антибиотики, определенные методом ИФА, дополнительного количества антибиотиков. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времен удерживания пиков антибиотиков пробы и антибиотиов добавки, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ 32797—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия хинолонов в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

VI.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотиков в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженные вещества в составе образца совпадают как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со сравнительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандартов антибиотиков;

б) соотношение сигнал/шум полученных пиков определяемых антибиотиков в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотиков в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае не выполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки»

VI.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ 32797—14 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2011.09610.

– Свидетельство № 01.00225/205-8-11 от 10.02.2011.

Раздел VII. Определение остаточных количеств сульфаниламидов в пищевой продукции животного происхождения

VII.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств сульфаниламидов в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

VII.1.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств сульфаниламидов методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) для следующих групп пищевых продуктов животного происхождения: молоко, мясо, субпродукты, рыба, креветки, цельное яйцо, мёд. Пределы обнаружения сульфаниламидов (по стандартному веществу), мг/кг (мг/дм^3): мясо (курица) и яйца – 0,0015; мясо (свинина), рыба, креветки, мёд – 0,002; молоко – 0,0035.

VII.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

В основе теста – взаимодействие антигенов с антителами. Лунки стрипов микротитровального планшета покрыты антителами захвата, связывающимися с антителами к сульфаниламидам. Добавляются стандартные или исследуемые растворы, а также конъюгат сульфаниламида с ферментом и антитела к сульфаниламидам. Свободный сульфаниламид и конъюгат сульфаниламида с ферментом конкурируют за центры связывания антител к сульфаниламиду (конкурентный иммуноферментный анализ). Одновременно антитела к сульфаниламиду связываются иммобилизированными антителами захвата. Несвязавшийся ферментный конъюгат затем удаляется в процессе промывки.

Далее в лунки планшета добавляется раствор субстрата/хромогена. Связавшийся ферментный конъюгат преобразует хромоген в вещество голубого цвета.

Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на желтый. Измерение проводится фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность раствора в лунках обратно пропорциональна концентрации сульфаниламида в пробе.

VII.1.3. Пределы полуколичественного метода определения

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств сульфаниламидов и сульфаметазина в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа представлены в табл. 7.1 и 7.2.

Таблица 7.1

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств сульфаниламидов в пищевых продуктах методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения*, мг/кг (мг/дм^3)	Среднее значение открываемости (степень извлечения по стандартному веществу), %
Молоко	0,004	101
Мясо скота и субпродукты	0,002	115
Мясо птицы и субпродукты	0,002	70
Рыба	0,002	120
Креветки	0,002	88
Мёд	0,002	88
* В отношении сульфаниламидов, к которым определена чувствительность		

Таблица 7.2

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств сульфаметазина в пищевых продуктах методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения*, мг/кг (мг/дм^3)	Среднее значение открываемости (степень извлечения по стандартному веществу), %
Молоко	0,100	100
Мясо и почки	0,034	74
* В отношении сульфаметазина, к которому определена чувствительность		

VII.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

VII.1.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 см^3 и от 0,1 до 5 см^3 с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы многоканальные с переменным объемом 0,03—0,3 $см^3$, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками	
Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г	
Фотометр вертикального типа фотометрирования (микропланшетный иммуноферментный анализатор) с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и светофильтром на 450 нм	
Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА	
pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	
Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81)

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

VII.1.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (50 ± 1) °C	
Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Измельчитель-гомогенизатор или фарфоровые ступки с пестиками	
Конические колбы на 50 и 100 $см^3$ с плотно закрывающимися пробками	ГОСТ 23932—90
Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2 вместимостью 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Магнитная мешалка	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 $см^3$ однократного применения	

Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 $см^3$	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 $см^3$	
Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 $см^3$	
Пробирки стеклянные объёмом не менее 15 $см^3$ с притертыми пробками	
Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С	
Холодильник бытовой электрический	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[13] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[13] до 20 000 g	
Цилиндры 1(2,3)-100(250)-1	ГОСТ 1770
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин	
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин	
Шкаф (стол) лабораторный	
Колонки для экстракции (например, RIDA® C18 (арт. R2002) в соответствии с Приложением VII (рекомендуемое)	
Устройство для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд) или пластиковый шприц на 20 $см^3$ с резиновой пробкой (для экстракции проб мёда)	

[13] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

Ультразвуковая ванна с эффективной мощностью ультразвука 60 Вт (дополнительно, для сухого молока)	

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

VII.1.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Метанол, хч	ГОСТ 6995
Этилацетат, сорт высший	ГОСТ 8981—78
Ацетонитрил с содержанием основного вещества не менее 99,9 %, для ВЭЖХ	
н-Гексан с содержанием основного вещества не менее 99,85 %, для ВЭЖХ;	
Натрий хлористый (HCl), хч	ГОСТ 4233
Натрия ацетат 3-водный ($CH_3COONa \times 3H_2O$) чда	ГОСТ 199—78
Соляная кислота (HCl) 1 н раствор (стандарт-титр)	

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

VII.1.4.4. Тест-системы для иммуноферментного анализа

Тест-системы для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) для определения сульфаниламидов – Тест-система № 1 и сульфаметазина – Тест-система № 2, укомплектованные в соответствии с Приложением VII (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

VII.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-наборов.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необхо-

димо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;

– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

VII.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения

VII.1.6.1. 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.

VII.1.6.2. Подготовка оборудования

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

VII.1.6.3. Хранение и использование наборов и реагентов

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

VII.1.6.4. Приготовление PBS-буфера с pH 7,4 для промывки

Способ 1. Используйте пакет с солью для приготовления PBS-буфера, находящийся в комплекте набора. Растворите содержимое целого пакетика в 1 л дистиллированной воды. Готовый PBS-буфер может храниться при температуре 2—8 °С в течение 4—6 недель.

Способ 2. Растворите содержимое пакетика в 100 $см^3$ дистиллированной воды, чтобы получить 10-кратный концентрат PBS-буфера. Рас-

твор может храниться около 8—12 недель при комнатной температуре (20—25 °С).

Для приготовления готового к употреблению PBS-буфера растворите одну часть 10-кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

VII.1.6.5. Приготовление 50 мМ раствора ацетатного буфера

Растворяют 4,1 г ацетата натрия в 900 см^3 дистиллированной воды, устанавливают pH = 5 ± 0,1 с помощью 1 н раствора соляной кислоты и доводят в мерной колбе до 1 000 см^3 дистиллированной водой.

VII.1.6.6. Приготовление 84%-го раствора ацетонитрила

Готовят раствор ацетонитрила в воде в соотношении 84 : 16 (по объему).

VII.1.6.7. Приготовление 2М раствора хлорида натрия

Растворяют навеску хлорида натрия 115 г в 900 см^3 дистиллированной воды и доводят в мерной колбе до 1 000 см^3.

VII.1.6.8. Микротитровальный планшет, сенсибилизированный антителами

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов. Остальные стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить в холодильник при температуре 2—8 °С.

VII.1.6.9. Приготовление 20%-го раствора метанола в буфере (по объему)

В 80 частях (объёмных) буфера для приготовления проб (в комплекте набора) растворить 20 частей (объёмных) метанола, перемешать.

VII.1.6.10. Приготовление буфера для разбавления проб для определения сульфаметазина (тест-система № 2) из концентрата

Для приготовления готового к использованию буфера для разбавления проб разбавляют 20-кратный концентрат (в комплекте тест-системы № 2) 1 : 20 (1 + 19) дистиллированной водой. Рекомендуется выполнять разведение буфера для разбавления в один этап (50 см^3 буфера для разбавления доливают в мерной колбе дистиллированной водой до метки 1 000 см^3).

Срок годности буфера для разбавления, соответствующий указанному на этикетке к концентрату, выдерживается при хранении при температуре не выше 4 °С.

VII.1.6.11. Приготовление буфера для разбавления стандартов для определения сульфаметазина (тест-система № 2) из 10-кратного концентрата

Для приготовления готового к использованию буфера разбавляют 10-кратный концентрат (в комплекте тест-системы № 2) приготовленным буфером для разбавленного проб (п. VII.1.6.10) в соотношении 1 : 10 (например, 1 см^3 концентрата + 9 см^3 готового буфера для разбавления проб (п. VII.1.6.10) и интенсивно перемешивают (на вортексе), после чего прогревают при (40 ± 1) °С. Мутность не влияет на результаты анализа. При выпадении осадка буфер следует гомогенизировать на вортексе.

VII.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

VII.1.7.1. Пробоподготовка для определения сульфаниламидов с использованием тест-системы № 1

VII.1.7.1.1. *Молоко (сырое, свежее, пастеризованное, обезжиренное, цельное), сухие молочные смеси, в том числе для детского питания*

Пробы молока разбавляют в соотношении 1 : 5 (1 + 4) буфером для разбавления проб из комплекта поставки (например, 0,1 см^3 молока + 0,4 см^3 буфера).

Для анализа вносят 0,05 см^3 подготовленной пробы в лунку планшета.

VII.1.7.1.2. *Мясо и субпродукты, в том числе птицы*

VII.1.7.1.2.1. *Мясо (свинина) и субпродукты (печень, почки)*

Все количество представительной пробы гомогенизируют вручную в фарфоровой ступке или в гомогенизаторе.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3, прибавляют 2 см^3 100%-го метанола и встряхивают на вортексе в течение 30 с, после чего центрифугируют 10 мин при 4 000 g при комнатной температуре (20—25 °С).

Метанольный экстракт в количестве 1,5 см^3 переносят в чистую пробирку и испаряют досуха в устройстве для испарения.

Сухой остаток растворяют в 0,5 см^3 буфера для разбавления проб из набора 1, добавляют 1 см^3 н-гексана (или н-гептана) для обезжиривания и встряхивают на вортексе в течение 10 с. После этого центрифугируют при температуре 20—25 °С в течение 10 мин при 4 000 g и отбирают **нижнюю водную** фазу в новую пробирку.

Для анализа вносят 0,05 см^3 **нижней водной** фазы в лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

VII.1.7.1.2.2. *Мясо птицы*

Все количество представительной пробы гомогенизируют вручную в фарфоровой ступке или в гомогенизаторе.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 2 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 см^3, прибавляют 6 см^3 84%-го раствора ацетонитрила и встряхивают в течение 10 мин, переворачивая пробирку вверх-вниз, после чего центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре 15 °С (если нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы до 10 °С перед центрифугированием).

Супернатант в количестве 4 см^3 переносят в новую центрифужную пробирку, добавляют 2 см^3 2М раствора хлорида натрия (п. VII.1.6.7), 7 см^3 этилацетата и встряхивают в течение 10 мин (движениями вверх-вниз).

Центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре не выше 15 °С (если нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы до температуры не выше 10 °С перед центрифугированием).

Весь супернатант переносят в новую центрифужную пробирку и испаряют досуха в устройстве для испарения.

Сухой остаток растворяют в 1 см^3 буфера для разбавления проб из набора 1, перемешивают на вортексе 1 мин, добавляют 1 см^3 н-гексана (или н-гептана), перемешивают на вортексе еще 2 мин.

Полученную смесь центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре не выше 15 °С (если нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы до температуры не выше 10 °С перед центрифугированием) и отбирают **нижнюю водную** фазу в чистую пробирку.

Для анализа вносят 0,05 см^3 нижней водной фазы в лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

VII.1.7.1.3. *Пищевая продукция аквакультуры животного происхождения (сырая, охлажденная, мороженная, варено-мороженная)*

Рыба и креветки – пробоподготовка по п. VII.1.7.1.2.1.

VII.1.7.1.4. *Яйца*

Пробоподготовка по п. VII.1.7.1.2.2.

VII.1.7.1.5. *Мёд*

Навеску мёда в количестве 3 г вносят в центрифужную пробирку вместимостью 15 $см^3$ и встряхивают с 6 $см^3$ 50 мМ ацетатного буферного раствора, pH 5,0 (п. VII.1.6.5) до полного растворения.

Центрифугируют полученную смесь 10 минут при 4000 g при комнатной температуре (20—25 °С), полученный прозрачный супернатант отбирают в пустую пробирку.

Готовят 1 $см^3$ раствора метанола в буфере для разбавления проб (из комплекта набора) (20 : 80 по объему, например, 0,2 $см^3$ метанола и 0,8 $см^3$ буфера). Для удаления воздушных пузырьков непосредственно перед использованием раствор перемешивают на вортексе.

Далее проводят очистку методом твердофазной экстракции с помощью колонок RIDA® C18 в соответствии со следующей процедурой.

Очистка раствора мёда методом твердофазной экстракции

Скорость потока 1 кап./с.

Кондиционирование колонки RIDA® C18 проводят следующим образом: колонку промывают сначала 2 $см^3$ 100 %-го метанола, а затем 2 $см^3$ 50 мМ ацетатного буферного раствора (п. VII.1.6.5), используя устройства для твердофазной экстракции (вакуумный манифолд) и руководствуясь инструкцией по его эксплуатации.

Примечание. При отсутствии устройства для твердофазной экстракции для создания давления воздуха на входе в колонку допускается использование пластикового шприца на 20 $см^3$ с резиновой пробкой, соединенного с колонкой через стеклянный буферный цилиндр и пластиковый переходник.

После кондиционирования на подготовленную колонку наносят весь объем супернатанта и медленно продавливают через колонку.

Затем колонку промывают 8 $см^3$ 50 мМ ацетатного буферного раствора (п. VII.1.6.5), удаляют из нее остатки жидкости, после чего высушивают в токе воздуха или азота в течение 2 мин.

Адсорбированные на колонке вещества медленно элюируют 1 $см^3$ раствора метанола в буфере для разбавления проб (20 : 80 по объему) в чистую пробирку.

Элюат разбавляют в соотношении 1 : 3 (1 + 2) буфером для разбавления проб (например, 0,1 $см^3$ элюата + 0,2 $см^3$ буфера).

Для анализа вносят 0,05 $см^3$ подготовленной пробы в лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 1.

VII.1.7.2. Пробоподготовка для определения сульфаметазина с использованием тест-системы № 2

VII.1.7.2.1. *Молоко*

VII.1.7.2.1.1. *Молоко обезжиренное*

Пробы молока разбавляют в соотношении 1 : 5 (1 + 4) приготовленным к использованию буфером для разбавления проб (п. VII.1.6.10) (например, 0,05 $см^3$ молока с 0,45 $см^3$ буфера для разбавления).

Для анализа вносят 0,05 $см^3$ подготовленной пробы в лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 10.

VII.1.7.2.1.2. *Молоко жирное*

Пробу молока центрифугируют для обезжиривания в течение 10 мин при 3 000 g и температуре не выше 10 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры не выше 10 °С).

Верхний жирный слой полностью удаляют (шпателем, стеклянной палочкой или с помощью пипетки Пастера) и смешивают пробу обезжиренного молока с буфером для разбавления (п. VII.1.6.10) в соотношении 1 : 10 (1 + 9) (например, 0,05 $см^3$ молока с 0,45 $см^3$ буфера для разбавления).

Для анализа вносят 0,05 $см^3$ подготовленной пробы в лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 10.

VII.1.7.2.2. Полуколичественный метод: мясо и почки (в том числе мясо кролика).

От мяса (или почек) отделяют жир и гомогенизируют пробу с помощью гомогенизатора или миксера до пастообразного состояния.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 5 г интенсивно перемешивают с 20 $см^3$ смеси ацетонитрил/вода (п. VII.1.6.6) в течение 10 мин, затем центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре не выше 15 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 10—15 °С).

Супернатант объемом 3 $см^3$ разбавляют 3 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют к раствору 4,5 $см^3$ этилацетата и перемешивают в течение 10 мин.

Для разделения фаз смесь центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре не выше 15 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре

с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 10—15 °С).

Этилацетатный супернатант переносят в пустую пробирку и испаряют экстракт досуха в устройстве для испарения.

Сухой остаток растворяют в 1,5 $см^3$ буфера для разбавления проб (п. VII.1.6.10), для обезжиривания раствора добавляют в пробирку 1,5 $см^3$ н-гексана (н-гептана) и перемешивают 5 мин. Затем раствор центрифугируют 10 мин при 3 000 g и температуре не выше 15 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 10—15 °С). Верхний гексановый слой по окончании центрифугирования полностью удаляют, **нижнюю водную фазу** отбирают в пустую пробирку.

Для анализа вносят 0,05 $см^3$ **нижней водной** фазы в лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 2,5.

VII.1.7.2.3. Качественный метод: Мясо и почки (исключая мясо кролика).

Для анализа используют свежее или замороженное мясо (мышцы или почки).

Замороженные пробы размораживают при комнатной температуре (20—25 °С), промывают дистиллированной водой и просушивают с помощью фильтровальной бумаги.

От исследуемых образцов отделяют жир.

Навеску образца в количестве 1 г помещают в пробирку, добавляют 11 $см^3$ готового буфера для разбавления (п. VII.1.6.10). Содержимое пробирки гомогенизируют при 13 500 об./мин в течение 30 с с помощью гомогенизатора (ультратюрекса) или миксером в течение 3—5 мин.

Полученную смесь центрифугируют 10 мин при 4 000 g и комнатной температуре (20—25 °С), супернатант с помощью пипетки отбирают в чистую пробирку, избегая попадания жира в пипетку.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ супернатанта на лунку планшета.

VII.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

VII.1.8.1. Общие положения

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.

2. 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.

VII.1.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

Подготовку тест-системы к исследованиям проводят следующим образом:

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

VII.1.8.3. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводят поэтапно, используя соответствующую тест-систему (№ 1 или № 2, п. VII.1.4.4):

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

2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 $см^3$ каждой концентрации раствора стандарта, раствора подготовленной пробы продукта, для каждого раствора использовать новые наконечники.

3. Добавляют по 0,05 $см^3$ смеси ферментного конъюгата в каждую лунку.

4. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 $см^3$ раствора антител. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 1 часа в темном месте.

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

6. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер по п. VII.1.6.4), 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.

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

7. После отмывания добавляют по 0,1 $см^3$ смеси субстрата/хромогена (для тест-системы № 1) или 0,05 $см^3$ субстрата и 0,05 $см^3$ хромогена (для тест-системы № 2) в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 15 мин в темном месте.

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

VII.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

VII.1.9.1. 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 ($А_{450нм} < 0,8$) 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.

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

VII.1.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа используется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

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

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

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

X – концентрация антибиотика в растворе, мкг/дм^3.

Расчёт коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \quad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы.

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

VII.1.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов антибиотика (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

VII.1.9.4. 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.

VII.1.9.5. Концентрацию сульфаниламидов (x) в мкг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

VII.1.9.6. Массовую концентрацию (содержание) сульфаниламидов в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 7.3;

K – коэффициент пересчета мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000.

Таблица 7.3

Факторы разбавления для расчёта содержания сульфаниламидов в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления, тест-система № 1	Фактор разбавления, тест-система № 2
Молоко, детские смеси	5	10
Мясо, субпродукты	1	2,5
Мёд	1	–
Яйцо, рыба, креветки	1	–
Почки	–	2,5

VII.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

VII.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если содержание компонента выше предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 7.1 и 7.2), то результат анализа представляют в виде:

«*сульфаниламиды в молоке обнаружены*».

Если содержание компонента ниже предела определения для соответствующего вида продукта (табл. 7.1 и 7.2), то результат анализа представляют в виде:

«*сульфаниламиды в молоке не обнаружены*».

VII.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения

При обнаружении сульфаниламидов в исследованных образцах пищевых продуктов полуколичественным методом анализа на уровне МДУ и выше необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение VII
(рекомендуемое)

Комплектация тест-систем для определения сульфаниламидов[14]

Тест-система № 1 для определения сульфаниламидов
(на примере RIDASCREEN® Sulfonamide, art. R3004)

Набор для определения сульфаниламидов по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Комплект стандартных концентрированных растворов 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.
3. Конъюгат – 10 см^3.
4. Антитела – 6 см^3.
5. Готовая смесь субстрата с хромогеном содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин – 10 см^3.
6. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 14 см^3.
7. Буфер для разбавления проб – 110 см^3.
8. PBS-буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина – 1 пакет.

Тест-система № 2 для определения сульфаметазина
(на примере RIDASCREEN® Sulfamethazin art. R3001)

Набор для определения сульфаметазина по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Комплект стандартных концентрированных растворов со следующими концентрациями: 0, 10, 30, 90, 270, 810 мкг/дм^3 в воде по 1,3 см^3 – 6 шт.
3. Конъюгат, концентрат (×11) – 10 см^3.
4. Антитела, концентрат (×11) – 6 см^3.
5. Субстрат – 7 см^3.
6. Хромоген – 7 см^3.
7. Стоп-реагент – 14 см^3.
8. Буфер для разбавления, концентрат (×20) – 60 см^3.
9. Буфер для разбавления стандартов, концентрат (×10) – 1 см^3.

Специфичность методики определения сульфаниламидов тест-системой для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), установленная по перекрестной чувствительности к исследо-

[14] Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

ванным антимикробным средствам в буферной системе для *тест-системы № 1* (на примере RIDASCREEN® Sulfonamide, арт. R3004), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
Сульфаметоксипиридазин	100
Сульфапиридин	> 100
Сульфаметоксидиазин	58
Сульфаметоксазол	75
Сульфадиметоксин	41
Сульфахиноксалин	34
Сульфахлоропиридазин	19
Сульфамеразин	18
Сульфадиазин	15
Сульфаметизол	14
Сульфадоксин	10
Сульфахлоропиразин	9
Сульфагуанидин	5
Сульфафеназол, сульфаметазин, сульфизоксазол, сульфаниламид	2
Сульфацетамид	1

Специфичность к антимикробным средствам для других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

Специфичность методики определения сульфаниламидов тест-системой для непрямого твердофазного конкурентного иммунофер-ментного анализа (ИФА), установленная по перекрестной чувствительности к исследованным антимикробным средствам в буферной системе *для тест-системы № 2* (на примере RIDASCREEN® Sulfamethazin, арт. R3001), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
Сульфаметазин	100
Сульфамеразин	56
Сульфамоксол	2
Все прочие сульфонамиды	< 1

Специфичность к антимикробным средствам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

VII.2. Определение сульфаниламидов методами подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.)

VII.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания сульфаниламидов проводится в молоке и молочных продуктах, яйцах и яичных продуктах, мясе, мясных продуктах и продуктах из мяса птицы, мёде, рыбе и морепродуктах и в продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 1,0—1 000,0 мкг/кг.

VII.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотиков на уровнях, близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотиков, обнаруженных методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержаний антибиотиков в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчет берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутст-

вия антибиотиков в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода определения равно или выше МДУ, необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотиков проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотиков проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотиков в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствуют антибиотики, определенные методом ИФА, дополнительного количества антибиотиков. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времен удерживания пиков антибиотиков пробы и антибиотиков добавки, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия сульфаниламидов в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

VII.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотиков в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженные вещества в составе образца совпадают как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со сравнительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандартов антибиотиков;

б) соотношение сигнал/шум полученных пиков определяемых антибиотиков в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотиков в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае не выполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

VII.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2011.09610.

– Свидетельство № 01.00225/205-8-11 от 10.02.2011.

Раздел VIII. Определение остаточных количеств нитроимидазолов в пищевой продукции животного происхождения

VIII.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств диметридазола в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

VIII.1.1. Область применения полуколичественного метода определения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения остаточных количеств диметридазола методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией (при 450 нм) (далее – ИФА) для пищевых продуктов животного происхождения (мг/кг): мяса, курицы, яиц – 0,0003, молока – 0,0006 и креветок – 0,0008.

VIII.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

Микротитровальный планшет тест-системы состоит из одного предварительно сенсибилизированного планшета (12 стрипов, 8 лунок каждый). Меченый пероксидазой хрена диметридазол вместе с растворами стандартов или проб вносят в лунки. Свободный диметридазол в пробах или стандартных растворах и диметридазол конъюгата конкурируют за места связывания со специфичными антителами (конкурентный иммуноферментный анализ).

После первого этапа инкубации в 1 ч несвязанные реагенты удаляются на этапе отмывки. Количество связанного конъюгата диметридазола визуально может быть оценено через добавление раствора субстрата/хромогена (H2O2/ТМБ). Связанные молекулы конъюгата диметридазола с пероксидазой преобразуют бесцветный хромоген в окрашенные продукты реакции.

Субстратная реакция останавливается внесением серной кислоты. Интенсивность окраски измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации диметридазола в пробе.

VIII.1.3. Пределы полуколичественного метода определения

Таблица 8.1

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств диметридазола в пищевой продукции методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения, мг/кг (мг/дм^3)
Креветки	0,0008
Мясо скота и птицы	0,0003
Молоко	0,0006
Яйцо	0,0003

VIII.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

VIII.1.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 см^3 и от 0,1 до 5 см^3, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы многоканальные с переменным объемом 0,03—0,3 см^3, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г

Фотометр вертикального типа фотометрирования (микропланшетный иммуноферментный анализатор) с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и светофильтром на 450 нм

Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА

pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01

Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1 000 см^3 ГОСТ 1770—74

Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 $см^3$	

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

VIII.1.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[15] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[15] до 20 000 g	
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин	
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин	
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов, или фарфоровые ступки с пестиками)	
Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С	
Холодильник бытовой электрический	
Конические колбы на 100 $см^3$	ГОСТ 23932—90
Стеклянные пробирки на 4 $см^3$	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 $см^3$ однократного применения	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 $см^3$	

[15] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/ RFS) в скорость центрифугирования (об./мин) приведен в Приложении для всех разделов.

Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 $см^3$
Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 $см^3$
Перчатки резиновые
Шкаф (стол) лабораторный с вытяжным устройством
Баня водяная лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (50 ± 1) °С
Ультразвуковая ванна с эффективной мощностью ультразвука 60 Вт (дополнительно для сухого молока)

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

VIII.1.4.3. Реактивы

Метанол, хч	ГОСТ 6995
Ацетонитрил с содержанием основного вещества не менее 99,9 % для ВЭЖХ	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Натрий фосфорнокислый трехзамещенный 12-водный (тринатрийфосфат) ($Na_3PO_4 \times 12H_2O$), чда	
Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), хч	ГОСТ 4172—76

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

VIII.1.4.4. Тест-система для иммуноферментного анализа

Тест-система для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением VIII (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

VIII.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном методе определения

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

новленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-систем.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;

– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

VIII.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения

VIII.1.6.1. 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.

VIII.1.6.2. Подготовка оборудования

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

VIII.1.6.3. Хранение и использование тест-систем и реагентов

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

VIII.1.6.4. Приготовление моющего буфера

Разбавить **концентрат моющего буфера** в соотношении 1 : 20 (1 + 19) деминерализованной водой (например, 2 $см^3$ концентрата

+ 38 $см^3$ деминерализованной воды, достаточно для 4 микротитровальных стрипов, т. е. 32 лунок). Разбавленный буфер может храниться при 2—8 °С до конца срока годности, указанного на концентрате.

VIII.1.6.5. Приготовление буфера для разбавления (10-кратный концентрат)

Буфер для разбавления проб поставляется в виде 10-кратного концентрата. Перед разбавлением (10 $см^3$ буфера + 90 $см^3$ дистиллированной воды) концентрированный буфер должен дойти до комнатной температуры и быть тщательно перемешанным. Концентрированный буфер может содержать осадок. Перемешайте тщательно перед разбавлением дистиллированной водой. Разбавленный буфер может храниться в холодильнике (2—8 °С) до истечения срока годности, указанного на этикетке тест-системы.

VIII.1.6.6. Приготовление 75%-го раствора метанола

Готовят 75%-й раствор метанола, смешивая метанол с водой в соотношении 3 : 1 (об/об), тщательно перемешивают.

VIII.1.6.7. Приготовление 0,5 н раствора гидроокиси натрия

Навеску гидроокиси натрия в количестве 20 г, разводят в мерной колбе объемом 1 000 $см^3$ дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

VIII.1.6.8. Приготовление раствора субстрата

Раствор субстрата (готов к использованию) образует осадок при 4 °С. Пред исследованием убедиться, что данный флакон дошел до комнатной температуры (хранить в темноте) и перемешать перед дозированием в лунки.

VIII.1.6.9. Приготовление раствора конъюгата (100-кратный концентрат)

Концентрированный конъюгат центрифугируют в течение короткого времени (1 мин при 1 000 g). Для восстановления разбавляют конъюгат в соотношении 1 : 100 буфером для разбавления (например, 0,010 $см^3$ + 0,990 $см^3$ буфера для разбавления). На 2 стрипа по 8 лунок требуется 0,400 $см^3$ разбавленного конъюгата.

Неиспользованный концентрированный конъюгат хранят при 2—8 °С.

VIII.1.6.10. Микротитровальный планшет, сенсибилизированный антителами

Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов. Остальные стрипы следует тщательно упако-

вать в фольгированный пакет вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить в холодильник при температуре 2—8 °С.

VIII.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

VIII.1.7.1. Подготовка проб креветок

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

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 2 г переносят в пробирку на 15 $см^3$ и приливают 8 $см^3$ ацетонитрила и тщательно перемешивают на вортексе, после чего помещают пробирки в ультразвуковую баню на 5 мин.

Полученную смесь центрифугируют 10 минут при 2 000 g для разделения. Супернатант в количестве 4 $см^3$ переносят в чистую пробирку и испаряют экстракт досуха при (45 ± 5) °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

Сухой остаток растворяют в 0,10 $см^3$ метанола, затем приливают 0,90 $см^3$ буфера для разбавления (п. VIII.1.6.5) и тщательно перемешивают на вортексе.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ подготовленного экстракта на лунку планшета. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 1,25.

VIII.1.7.2. Подготовка проб мяса птицы и яиц

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

Навеску гомогенизированного яйца в количестве 2 г или мяса переносят в пробирку вместимостью 50 $см^3$, приливают 8 $см^3$ ацетонитрила и немедленно перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Пробирки помещают в ультразвуковую баню (ванну) на 5 мин, затем центрифугируют при 2 000 g в течение 10 минут при комнатной

температуре. Супернатант переносят в чистую пробирку вместимостью 15 $см^3$ и испаряют экстракт досуха при (45 ± 5) °С в токе азота или воздуха, используя устройство для испарения.

К сухому остатку приливают 1 $см^3$ н-гексана и 1 $см^3$ смеси метанола и воды (3 : 1) (п. VIII.1.6.6) тщательно перемешивают на вортексе в течение 10 с.

Смесь помещают на водяную баню при (40 ± 1) °С на 5 мин, затем центрифугируют при 2 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре, аккуратно отбирают верхний гексановый слой и любые остатки эмульсии, которые могут появиться на разделе фаз. После удаления в пробирке должно остаться примерно 1 $см^3$ раствора.

Остаток испаряют досуха. После восстанавливают пробу в 0,10 $см^3$ 100%-го метанола и 1,9 $см^3$ буфера для разбавления (п. VIII.1.6.5). Тщательно перемешивают на вортексе и выдерживают при 2—8 °С минимум в течение часа перед использованием для ИФА.

Так как проба должна быть охлаждена перед началом ИФА (обязательно), во время подготовки пробы следует держать на льду.

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

VIII.1.7.3. Подготовка проб молока и молокопродуктов

Важно! pH пробы влияет на конечный результат анализа.

Кислое молоко вносит помехи в выполнение ИФА. Перед анализом пробы молока и молочных продуктов нейтрализуют с помощью 0,5 н раствора натрия гидроокиси (п. VIII.1.6.7), доводя уровень pH до 7,0 ± 0,5.

Пробу молока с установленным нейтральным pH разводят в два раза буфером для разбавления (п. VIII.1.6.5) (например, 0,10 $см^3$ молока + 0,10 $см^3$ буфера для разбавления) и перемешивают.

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

VIII.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

VIII.1.8.1. Общие положения

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.

2. Не допускается заменять реагенты в составе одного комплекта реагентами из другого комплекта с другим номером партии. Не допуска-

ется перекрестное использование реагентов из комплектов с разными номерами партий.

VIII.1.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

Подготовку тест-системы к исследованиям проводят следующим образом:

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

VIII.1.8.3. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводится поэтапно:

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

2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 $см^3$ каждой концентрации стандартных растворов, 0,1 $см^3$ нулевого стандарта или 0,05 $см^3$ растворов подготовленных проб продуктов.

3. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 $см^3$ коньюгата (кроме лунок с нулевым стандартом). Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течении 60 мин в темноте. Следует избегать попадания

прямого солнечного света во время инкубации. Планшет следует накрыть пленкой для планшетов, поставляемой вместе с тест-системой.

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

5. Заполняют лунки буфером для промывки, 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 3 раза. Правильная отмывка лунок является важным этапом и решающим фактором воспроизводимости иммуноферментного анализа.

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

6. После отмывания добавляют по 0,1 $см^3$ смеси раствора субстрата в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 30 минут в темном месте.

7. По окончании инкубации добавляют в каждую лунку по 0,1 $см^3$ стоп-реагента. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и сразу после этого измеряют оптическую плотность в каждой лунке. Считать результаты следует в течение 5 мин после внесения стоп-раствора. Время от внесения стоп-реагента до измерения не должно превышать 30 мин.

VIII.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

VIII.1.9.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности содержимого лунок на планшетном фотометре (микропланшетном иммуноферментном анализаторе) при длине волны 450 нм. Оптическая плотность каждой лунки сравнивается с нулевым стандартом, значение которого принимается за 100 %.

Величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,5 ($А_{450нм} < 0,5$) является признаком порчи реагентов. Изменение окраски раствора субстрата перед постановкой анализа также является признаком порчи реагентов. Результаты анализа в таком случае не учитываются.

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

VIII.1.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа с помощью тест-систем имеется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

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

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

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

X – концентрация антибиотика в растворе, мкг/дм^3.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \quad (2)$$

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

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы.

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

VIII.1.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов демитридазола (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

VIII.1.9.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации демитридазола в мкг/дм^3 строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

VIII.1.9.5. Концентрацию демитридазола (x) в мкг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

VIII.1.9.6. Массовую концентрацию (содержание) антибиотика в мкг/кг в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы, приведенный в табл. 8.2;

K – коэффициент пересчёта мкг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000.

При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения (табл. 8.2).

Таблица 8.2

Факторы разбавления для расчета содержания демитридазола в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Креветки	1,25
Мясо скота и птицы	1
Молоко	2
Яйцо	1

VIII.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

VIII.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если выявлено содержание антибиотика выше предела определения (минимальной границы диапазона) для соответствующего вида продукта (табл. 8.1), то результат анализа представляют в виде:

«*демитридазол в молоке обнаружен*».

Если выявлено содержание антибиотика ниже предела определения (минимальной границы диапазона) для соответствующего вида продукта (табл. 8.1), то результат анализа представляют в виде:

«*демитридазол в молоке не обнаружен*».

VIII.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения

При обнаружении диметридазола в исследуемых образцах пищевых продуктов полуколичественным методом анализа на уровне МДУ и выше необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение VIII
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы для определения диметридазола
(на примере Dimetridazole ELISA)[16]

Набор для определения диметридазола по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок, покрытых антигеном (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Нулевой стандартный раствор (1 флакон 2 $см^3$).
3. Стандартные растворы (6 флаконов × 1 $см^3$/флакон): 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 мкг/$дм^3$ (нг/$см^3$).
4. Буфер для разбавления, концентрат (×10) – 2 $см^3$.
5. Концентрированный моющий буфер, концентрат (×20) – 30 $см^3$.
6. Стоп-раствор – 15 $см^3$.
7. Раствор субтрата – 12 $см^3$.
8. Ферментный конъюгат, концентрат (×100) – 12 $см^3$.

Специфичность методики определения диметридазола, установленная по перекрестной чувствительности к соответствующим антибиотикам в буферной системе (на примере Dimetridazole ELISA), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
Диметридазол	100
Метронидазол	7,4
Гидроксидиметридазол	5,3
Ронидазол	8,5
Ипронидазол	7,4
Никарбазин	0,1
Галофугинон	< 0,02
Диклазурил	< 0,02
Робенидин	< 0,02
Гидроксиметронидазол	0,1
Гидроксипронидазол	0,5

Специфичность к антимикробным веществам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

[16] Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

VIII.2. Определение нитроимидазолов методом подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.)

VIII.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания нитроимидазолов проводится в молоке и молочных продуктах, яйцах и яичных продуктах, мясе, мясных продуктах и продуктах из мяса птицы, мёде, рыбе и морепродуктах и в продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 1,0—1 000,0 мкг/кг.

VIII.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение антибиотиков на уровнях, близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию антибиотиков, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие антибиотиков, обнаруженных методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержаний антибиотиков в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчёт берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотиков в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если

определенное количество в интервале ошибки метода определения равно или выше МДУ, необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия антибиотиков проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия антибиотиков проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия антибиотиков в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном дополнительном внесении в пробу, в которой присутствуют антибиотики, определенные методом ИФА, дополнительного количества антибиотиков. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времен удерживания пиков антибиотиков пробы и антибиотиков добавки, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Отмечаем, что проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия нитроимидазолов в случае внутреннего контроля содержания антибиотиков на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

VIII.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** антибиотиков в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженные вещества в составе образца совпадают как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со срав-

нительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандартов антибиотиков;

б) соотношение сигнал/шум полученных пиков определяемых антибиотиков в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** антибиотиков в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае невыполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

VIII.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ Р 54904—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2011.09610.

– Свидетельство № 01.00225/205-8-11 от 10.02.2011.

Раздел IX. Определение остаточных количеств метаболитов нитрофуранов в пищевой продукции животного происхождения

IX.1. Методика полуколичественного определения остаточных количеств метаболитов нитрофуранов АМОЗ и АОЗ в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа

IX.1.1. Область применения

В настоящем разделе методических указаний установлен порядок полуколичественного определения методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией результатов (при 450 нм) (далее – ИФА) остаточных количеств метаболитов нитрофуранов (табл. 9.1):

а) 3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (АМОЗ) в креветках, мясе (курица, свинина, говядина), печени (говяжьей и свиной), рыбе, цельном яйце. Пределы обнаружения АМОЗ (по стандартному веществу) – 0,2 мг/кг;

б) 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ) в креветках, мясе (курица, свинина, говядина), печени, рыбе, цельном яйце и молоке. Пределы обнаружения АОЗ (по стандартному веществу), мкг/кг (мкг/дм^3): в креветках, рыбе, молоке – 0,05; мясе, печени, яйце – 0,1.

Таблица 9.1

Обозначения метаболитов нитрофуранов

Название метаболита	Сокращенное название	Нитрофуран-предшественник
3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон	АМОЗ	Фуральтадон
3-амино-2-оксазолидинон	АОЗ	Фуразолидон
семикарбазид	СЕМ	Нитрофуразон
1-аминогидантоин	АГД	Нитрофурантоин

IX.1.2. Методика измерений при полуколичественном методе определения

В основе принципа действия тест-системы лежит реакция «антиген – антитело».

Лунки микротитровального планшета покрыты антителами захвата к антителам к АМОЗ. В лунки добавляют стандартные растворы АМОЗ или растворы проб, конъюгат АМОЗ и антитела к АМОЗ. Свободные молекулы АМОЗ и АМОЗ из конъюгата конкурируют за места связывания с антителами к АМОЗ (конкурентный иммуноферментный анализ).

В то же время антитела к АМОЗ связываются на планшете иммобилизированными антителами захвата. Все несвязанные молекулы конъюгата удаляются на этапе отмывки. В лунки добавляют раствор субстрат/хромогена и выполняют инкубацию. Связанные молекулы конъюгата преобразуют хромоген в окрашенные в синий продукты реакции. Внесение стоп-раствора ведет к переходу окраски от синей к желтой. Измерение оптической плотности выполняют фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность обратно пропорциональна концентрации АМОЗ в пробе.

Лунки стрипов микротитровального планшета покрыты антителами захвата, связывающимися с анти-АОЗ антителами. Добавляются стандартные или исследуемые растворы, а также коньюгат АОЗ с ферментом и анти-АОЗ антитела. Свободный АОЗ и коньюгат АОЗ с ферментом конкурируют за центры связывания анти-АОЗ антител (конкурентный иммуноферментный анализ). Одновременно анти-АОЗ антитела связываются неподвижными антителами захвата. Несвязавшийся ферментный коньюгат затем удаляется в процессе промывки. Далее в лунки планшета добавляется раствор субстрата/хромогена. Связавшийся ферментный коньюгат преобразует хромоген в вещество голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на желтый. Измерение проводится фотометрически при 450 нм. Оптическая плотность раствора в лунках обратно пропорциональна концентрации АОЗ в пробе.

IX.1.3. Пределы полуколичественного метода определения

Пределы полуколичественного определения остаточных количеств метаболита нитрофурана – 3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (АМОЗ) в пищевой продукции животного происхождения методом иммуноферментного анализа, проводимого в полном соответствии с приведенной процедурой, представлены в табл. 9.2, метаболита нитрофурана – 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ) – в табл. 9.3.

Таблица 9.2

Пределы полуколичественного определения метаболита нитрофурана – 3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (АМОЗ) в пищевых продуктах методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения*, мг/кг	Среднее значение открываемости (степень извлечения по стандартному веществу), %
Креветки, рыба, цельное яйцо	0,00022	80—100
Говядина, печень	0,00025	70—90
Курятина	0,00024	70—100
Свинина	0,00027	70—80
* В отношении метаболита нитрофурана – 3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (АМОЗ), к которым определена чувствительность		

Таблица 9.3

Пределы полуколичественного определения метаболита нитрофурана – 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ) в пищевых продуктах методом ИФА

Пищевые продукты	Нижний предел определения*, мг/кг (мкг/дм^3)	Среднее значение открываемости (степень извлечения по стандартному веществу), %
Яйцо	0,00010	90—100
Креветки, рыба	0,00005	85—100
Молоко	0,00006	80—100
Мясо (курица, говядина), печень	0,00010	80—100
Мясо (свинина)	0,00010	75—100
* В отношении метаболита нитрофурана – 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ), к которым определена чувствительность		

IX.1.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы, реактивы и тест-системы для полуколичественного метода определения

IX.1.4.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с переменным объемом от 0,02 до 0,2 см^3 и от 0,1 до 5 см^3, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1 %, с одноразовыми наконечниками

Автоматические пипеточные дозаторы многоканальные с переменным объемом 0,03—0,3 см^3, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ± 1,0 %, с одноразовыми наконечниками

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности, погрешность взвешивания 0,01 г

Фотометр вертикального типа фотометрирования (микропланшетный иммуноферментный анализатор) с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и светофильтром на 450 нм

Компьютер с программным обеспечением для обработки результатов ИФА

pH-метр или анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01

Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 $см^3$	

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

IX.1.4.2. Вспомогательные устройства, посуда и материалы

Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[17] до 4 000 g и возможностью охлаждения или без охлаждения	
Центрифуга настольная с устанавливаемым относительным центробежным ускорением (ОЦУ/RFS)[17] до 20 000 g	
Шейкер для пробирок вортексного типа с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2 500 об./мин	
Шейкер переворачивающего вертикального вращения на 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об./мин	
Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов, или фарфоровые ступки с пестиками)	
Магнитная мешалка	
Наконечники для автоматических пипеток вместимостью 0,300; 1,000 $см^3$ однократного применения	
Гомогенизатор для восстановления жидких продуктов или миксер	
Устройство для испарения экстрактов или роторный испаритель со встроенным мембранно-вакуумным насосом и рабочим диапазоном температур до 60 °С	
Холодильник бытовой электрический	
Конические колбы на 100 $см^3$	ГОСТ 23932—90

[17] Пересчет относительного центробежного ускорения (в единицах g) (ОЦУ/RFS) в скорость центрифугирования (об/мин) приведен в Приложении для всех разделов.

Колбы мерные 2-го класса точности 2-100-2 на 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 15 $см^3$	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с завинчивающимися крышками вместимостью 50 $см^3$	
Пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5—2,0 $см^3$	
Шкаф (стол) лабораторный с вытяжным устройством	
Водяная баня лабораторная с терморегулятором, обеспечивающая нагрев не менее (50 ± 1) °С	

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

IX.1.4.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Кислота соляная (HCl) стандарт-титр с молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$	
Натрия гидроокись (NaOH) стандарт-титр с молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$	
Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$)	ГОСТ 2493—75
Этилацетат, сорт высший	ГОСТ 8981—78
н-Гексан с содержанием основного вещества не менее 99,85 %, для ВЭЖХ	
Диметилсульфоксид (ДМСО), хч	
2-нитробензальдегид с содержанием основного вещества не менее 99 %	
Для анализа АОЗ/AOZ дополнительно:	
Калий железистосинеродистый 3-водный (желтая кровяная соль), хч	ГОСТ 4207—75
Цинк сернокислый 7-водный ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), хч	ГОСТ 4174—77

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

IX.1.4.4. Тест-системы для иммуноферментного анализа

Тест-системы непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА): № 1 – для определения метаболита нитрофурана АМОЗ и № 2 – для определения метаболита нитрофурана АОЗ

непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), укомплектованная в соответствии с Приложением IX (рекомендуемое).

Примечание. Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

IX.1.5. Требования безопасности, квалификация операторов и условия выполнения измерений при полуколичественном анализе

1. Исследования пищевых продуктов с использованием методики ИФА проводят с соблюдением требований техники безопасности, установленных для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007), а также в инструкции по использованию тест-систем.

2. При выполнении измерений с использованием планшетного иммуноферментного анализатора и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии ГОСТ Р 12.1.019—09 и инструкцию по эксплуатации прибора.

3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4. 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.

5. При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха: от 20 до 30 °С;

– относительная влажность воздуха: от 40 до 80 %.

IX.1.6. Подготовка к исследованию при полуколичественном методе определения

IX.1.6.1. 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.

IX.1.6.2. Подготовка оборудования

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

IX.1.6.3. Хранение и использование наборов и реагентов

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

IX.1.6.4. Приготовление буфера с pH 7,4 (PBS-буфер с твином) (моющий и для разведения проб)

Способ 1. Используют пакет с солью для приготовления PBS-буфера, входящий в комплект набора. Растворяют содержимое целого пакетика в 1 л дистиллированной воды. Готовый PBS-буфер может храниться при температуре 2—8 °С в течение 4—6 недель.

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

Для приготовления готового к употреблению PBS-буфера растворяют одну часть 10-кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

IX.1.6.5. Приготовление осадителей (Каррезы) (для анализа AOЗ / AOZ)

Осадитель 1 (Каррез I): навеску 15,21 г калия железистосинеродистого 3-водного разводят в мерной колбе объемом 100 $см^3$ дистиллированной водой до метки.

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

IX.1.6.6. Приготовление 1 М раствора соляной кислоты

Для приготовления 1 М раствора соляной кислоты из стандарт-титра мерную колбу емкостью 1 $дм^3$ наполняют дистиллированной водой – 500—600 $см^3$ и затем количественно переносят в нее содержимое ампулы с соляной кислотой, тщательно ополаскивая стенки ампулы дистиллированной водой, интенсивно перемешивают, после чего доводят объем раствора до метки. Тщательно перемешивают.

IX.1.6.7. Приготовление 1 М раствора натрия гидроокись (NaOH)

Для приготовления 1 М раствора натрия гидроокиси из стандарт-титра мерную колбу ёмкостью 1 $дм^3$ наполняют дистиллированной во-

дой – 500—600 см^3 и затем количественно переносят в нее содержимое ампулы натрия гидроокиси, тщательно ополаскивая стенки ампулы дистиллированной водой, интенсивно перемешивают, после чего доводят объем раствора до метки. Тщательно перемешивают.

IX.1.6.8. Приготовление 0,1 М раствора калия фосфорнокислого

Навеску 88,0 г калия фосфорнокислого двузамещенного 3-водного ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$) разводят в мерной колбе объемом 100 см^3 дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают.

IX.1.7. Подготовка проб пищевых продуктов для полуколичественного метода определения

1. Отбор проб осуществляют в соответствии с МУК 4.1.3534—18 «Подготовка проб для проведения исследований по определению остаточных количеств антибиотиков и антимикробных препаратов».

2. Хранение и транспортирование экстрактов, подготовленных для ИФА.

Готовые экстракты допускается хранить до начала анализа в пределах одной лаборатории при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Допускается транспортирование материала при температуре от 2 до 8 °°С в течение 1 суток. Доставленные в лабораторию образцы в виде экстрактов хранению не подлежат и сразу направляются на анализ.

При определении метаболита АМОЗ (AMOZ)

IX.1.7.1. *Подготовка проб*

Креветки, мясо (курица, свинина, говядина), печень (говяжья и свиная), рыба и цельное яйцо

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

Непосредственно перед использованием готовят 10 мМ раствор 2-нитробензальдегида в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для этого навеску 7,6 мг 2-нитробензальдегида растворяют в 5 см^3 ДМСО.

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1 г помещают в пробирку вместимостью 15 см^3 и смешивают с 4 см^3 дистиллированной воды, 0,5 см^3 1 М раствора соляной кислоты (п. IX.1.6.6) и 0,100 см^3 10 мМ раствора 2-нитробензальдегида (в ДМСО) и тщательно перемешивают.

IX.1.7.2. *Дериватизация*

Приготовленную смесь инкубируют при температуре 37 °С в течение примерно 16 часов для образования производного – NP-AMOZ.

Добавляют 5 см^3 0,1 М раствора K_2HPO_4 (п. IX.1.6.8), 0,4 см^3 1 М раствора NaOH (п. IX.1.6.7) и 5 см^3 этилацетата и энергично встряхивают в течение 30 с на вортексе.

Центрифугируют при комнатной температуре (20—25) °С в течение 10 мин при 3 000 g. Переносят 2,5 $см^3$ этилацетатной фракции (**верхний слой**) в новую чистую пробирку и испаряют досуха при 60 °С, используя устройство для испарения.

Растворяют сухой остаток в 1 $см^3$ н-гексана и тщательно перемешивают с 1 $см^3$ моющего буфера (п. IX.1.6.4). Центрифугируют при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 10 мин при 3 000 g. **Нижнюю водную фазу** отбирают в чистую пробирку.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ **нижней водной фазы** на лунку планшета. При расчёте конечного результата учитывают фактор разбавления – 2.

При определении метаболита АОЗ (AOZ)

IX.1.7.3. *Подготовка проб*

Креветки, мясо (курица, свинина, говядина), печень (говяжья и свиная), рыба и цельное яйцо (гомогенизированное перед анализом) – полностью гомогенизируют всё количество представительной пробы в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке.

Креветки

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1 г помещают в пробирку вместимостью 15 $см^3$, смешивают с 4 $см^3$ дистиллированной воды, 0,5 $см^3$ 1 М раствора соляной кислоты (п. IX.1.6.6) и 0,100 $см^3$ 10 мМ 2-нитробензальдегида (в ДМСО) (п. IX.1.7.1) при энергичном встряхивании.

Далее проводят процедуру по п. IX.1.7.4.

Говядина, печень (говяжья и свиная), рыба и цельное яйцо (белок и желток следует смешать перед анализом)

Навеску гомогенизированной пробы в количестве 1 г помещают в пробирку вместимостью 15 $см^3$, смешивают с 3,9 $см^3$ дистиллированной воды, 0,5 $см^3$ 1 М раствора соляной кислоты (п. IX.1.6.6) и 0,200 $см^3$ 10 мМ 2-нитробензальдегида (в ДМСО) (п. IX.1.7.1) при энергичном встряхивании.

Далее проводят процедуру по п. IX.1.7.4.

Мясо птицы и свинина

Навеску 1 г гомогенизированной пробы помещают в пробирку вместимостью 15 $см^3$, смешивают с 3,8 $см^3$ дистиллированной воды, 0,5 $см^3$ 1 М раствора соляной кислоты (п. IX.1.6.6) и 0,300 $см^3$ 10 мМ 2-нитробензальдегида (в ДМСО) (п. IX.1.7.1) при энергичном встряхивании.

Далее проводят процедуру по п. IX.1.7.4.

Молоко

Переносят 5 $см^3$ молока в стеклянную центрифужную пробирку, добавляют 0,250 $см^3$ раствора Карреза 1 и 0,250 $см^3$ Карреза 2 (п. IX.1.6.5), тщательно перемешивают на вортексе.

Центрифугируют при 4—12 °С (при отсутствии центрифуги с охлаждением допускается проводить центрифугирование при комнатной температуре с предварительным охлаждением проб в холодильнике до температуры 6—8 °С) в течение 10 мин при 3 000 g. Супернатант отбирают в чистую пробирку.

Смешивают 1,1 $см^3$ супернатанта с 3,8 $см^3$ дистиллированной воды, 0,5 $см^3$ 1 М соляной кислоты (п. IX.1.6.6) и 0,300 $см^3$ 10 мМ 2-нитробензальдегида (в ДМСО) (п. IX.1.7.1) и энергично встряхивают.

Далее проводят процедуру по п. IX.1.7.4.

IX.1.7.4. *Дериватизация*

Инкубируют при температуре (50 ± 1) °С в течение 3 ч, либо в течение примерно 16 часов при (37 ± 1) °С.

Добавляют 5 $см^3$ 0,1 М раствора K_2HPO_4 (п. IX.1.6.8), 0,4 $см^3$ 1 М раствора NaOH (п. IX.1.6.7) и 5 $см^3$ этилацетата и энергично встряхивают в течение 30 с. Дополнительно: для лучшего разделения фаз помещают пробирку в баню, нагретую до 50 °С.

Центрифугируют при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 10 мин при 3 000 g, переносят 2,5 $см^3$ этилацетатной фазы (верхний слой) в новую чистую пробирку и испаряют досуха при 60 °С в устройстве для испарения.

Растворяют сухой остаток в 1 $см^3$ н-гексана и тщательно перемешивают с 1 $см^3$ буфера для проб (п. IX.1.6.4). Центрифугируют при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 10 минут при 3 000 g. **Нижнюю водную фазу** отбирают в пустую пробирку.

Для анализа используют 0,05 $см^3$ **нижней водной фазы**. При расчете конечного результата учитывают фактор разбавления – 2.

IX.1.8. Проведение исследований при полуколичественном методе определения

IX.1.8.1. Общие положения

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.

2. 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.

IX.1.8.2. Подготовка тест-системы к исследованиям

Подготовку тест-системы к исследованиям проводят следующим образом:

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 2—8 °С.

2. Перед использованием тест-системы доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—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.

3. Перед непосредственным использованием встряхивают каждый флакон с реагентами.

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

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

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.

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

IX.1.8.1. Алгоритм проведения исследования

Анализ проводят поэтапно:

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

2. Добавляют в выбранные пары лунок по 0,05 $см^3$ каждой концентрации раствора стандарта, раствора подготовленной пробы продукта. Для каждого раствора необходимо использовать новые наконечники.

3. Добавляют в лунки по 0,05 $см^3$ ферментного конъюгата.

4. Затем в каждую лунку добавляют по 0,05 $см^3$ раствора антител. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 1 ч в тёмном месте.

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

6. Заполняют лунки буфером для промывки (PBS-буфер по п. IX.1.6.4), 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.

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

7. После отмывания добавляют по 0,1 $см^3$ субстрата/хромогена в каждую лунку. Перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 15 мин в темном месте.

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

IX.1.9. Учёт и обработка результатов при полуколичественном методе определения

IX.1.9.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на микропланшетном иммуноферментном анализаторе (планшетный фотометр, ридер) при длине волны 450 нм против нулевого стандарта, значение которого принимается за 100 %.

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

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

IX.1.9.2. Для обработки результатов иммуноферментного анализа с помощью тест-систем имеется специальное программное обеспечение, рекомендованное изготовителем тест-системы. Пример стандартной калибровочной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

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

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

B – оптическая плотность раствора антибиотика;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией антибиотика 0,00 нг/дм^3;

X – концентрация антибиотика в растворе, нг/дм^3.

Расчёт коэффициентов линейной регрессии a и b проводится с помощью метода наименьших квадратов на основании пар значений B/B_0, $\ln C_i$, 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:

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{\frac{B_x}{B_0} - a}{b}\right), \text{ где} \quad (2)$$

X – концентрация метаболита нитрофурана в пробе, нг/кг (нг/дм^3);

B_x – оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F – фактор разбавления пробы.

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

IX.1.9.3. 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:

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

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

B_i – среднее значение оптической плотности стандартных растворов метаболита нитрофурана (или исследуемых растворов продуктов);

B_0 – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

IX.1.9.4. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации метаболитов нитрофуранов в нг/дм^3 строят калибровочную кривую (градуировочный график) в полулогарифмической системе координат.

IX.1.9.5. Концентрацию метаболитов нитрофурана (x) в нг/дм^3 считывают по калибровочной кривой соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (3).

IX.1.9.6. Массовую концентрацию (содержание) метаболита нитрофурана в мг/кг в испытуемой пробе (X) рассчитывают по формуле:

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

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

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

F – фактор разбавления испытуемой пробы;

K – коэффициент пересчета нг/дм^3 в мг/кг (мг/дм^3 – для жидких проб), равный 1 000 000.

При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает значения по табл. 9.4 и 9.5.

Таблица 9.4

Факторы разбавления для расчёта содержания метаболита нитрофурана – 3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (АМОЗ/AMOZ) в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Мясо и субпродукты, в том числе птицы	2
Рыба	2
Яйца и яичные продукты (сырые, жидкие)	2
Креветки	2

Таблица 9.5

Факторы разбавления для расчёта содержания метаболита нитрофурана – 3-амино-2-оксазолидинон (АОЗ/AOZ) в различных пробах

Пищевые продукты	Фактор разбавления
Мясо и субпродукты, в том числе птицы	2
Рыба	2
Яйца и яичные продукты (сырые, жидкие)	2
Креветки	2

IX.1.10. Расчёт результатов параллельных определений при полуколичественном методе определения

За результат полуколичественного анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \text{ где}$$

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

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

IX.1.11. Оформление результатов определений при полуколичественном методе определения

Если выявлено содержание антибиотика выше предела определения (минимальной границы диапазона) для соответствующего вида продукта (табл. 9.2 и 9.3), то результат анализа представляют в виде:

«*метаболит нитрофурана АОЗ в молоке обнаружен*» или

«*метаболит нитрофурана АМОЗ в молоке обнаружен*».

Если выявлено содержание антибиотика ниже предела определения (минимальной границы диапазона) для соответствующего вида продукта (табл. 9.2 и 9.3), то результат анализа представляют в виде:

«*метаболит нитрофурана АОЗ в молоке не обнаружен*» или

«*метаболит нитрофурана АМОЗ в молоке не обнаружен*».

IX.1.12. Подтверждение результата полуколичественного определения

При обнаружении любого из метаболитов нитрофуранов в исследуемых образцах пищевых продуктов полуколичественным методом анализа на уровне МДУ и выше необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого аттестованного метода (например, ВЭЖХ-МС).

Приложение IX
(рекомендуемое)

Комплектация тест-систем для определения метаболитов нитрофурана[18]

Тест-система №1 для определения метаболита нитрофурана АМОЗ
(на примере RIDASCREEN® Nitrofuran (AMOZ) art. R3711)

Тест-система № 1 для определения антибиотиков тетрациклиновой группы по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Навеска 2-нитробензальдегид – 100 мг.
3. Комплект стандартных растворов, готовых к использованию, со следующими концентрациями: 0; 100; 300; 900; 2 700; 8 100 нг/дм^3 в воде по 1,3 см^3 – 6 шт.
4. Конъюгат – 6 см^3.
5. Антитела – 6 см^3.
6. Готовая смесь субстрата с хромогеном содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин – 10 см^3.
7. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 14 см^3.
8. PBS-буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина – 1 пакет.

Тест-система № 2 для определения метаболита нитрофурана АОЗ
(на примере RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) art. R3703)

Тест-система № 2 для определения метаболита нитрофурана АОЗ по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом включает следующие компоненты:

1. Микротитровальный планшет на 96 лунок (12 стрипов с 8 отделяемыми лунками каждый), сенсибилизированных антителами «захвата», в упаковке из фольги в комплекте с влагопоглотителем.
2. Навеска 2-нитробензальдегид – 100 мг.
3. Комплект стандартных растворов, готовых к использованию, со следующими концентрациями: 0; 0,25; 50; 100; 200; 400 нг/дм^3 в воде по 1,3 см^3 – 6 шт.
4. Конъюгат – 6 см^3.
5. Антитела – 6 см^3.

[18] Допускается использование других тест-систем с аналогичными или лучшими характеристиками. При использовании других тест-систем пробоподготовку и анализ проводить в соответствии с прилагаемой инструкцией.

6. Готовая смесь субстрата с хромогеном содержит пероксид карбамида и тетраметилбензидин – 10 $см^3$.

7. Стоп-реагент, содержит 1 н серную кислоту – 14 $см^3$.

8. PBS-буфер в виде сухой соли для приготовления 10 мМ фосфатного буфера, pH 7,4, содержащей 0,05 % твина – 1 пакет.

Специфичность методики определения метаболита нитрофурана АМОЗ тест-системой для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), установленная по перекрестной чувствительности к метаболитам нитроффуранов АОЗ, АГД, СЕМ в буферной системе (на примере RIDASCREEN® Nitrofuran (AMOZ), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
НП-АМОЗ (NP-AMOZ)	100
АОЗ, АГД, СЕМ (AOZ, AHD, SEM)	< 0,05

Специфичность к антимикробным веществам для других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

Специфичность методики определения метаболита нитрофурана АОЗ тест-системой для непрямого твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА), установленная по перекрестной чувствительности к метаболитам нитроффуранов: НП-АГД, НП-АМОЗ, нитрофурантоин, фуразолидон, AMOZ, AHD, SEM (на примере RIDASCREEN® Nitrofuran (AOZ) арт. R3703), представлена ниже.

Вещество	Специфичность, %
NP-AOZ	100
NP-AHD, NP-AMOZ	< 0,01
Нитрофурантоин	< 0,01
Фуразолидон	< 0,01
AMOZ, AHD, SEM	< 0,01

Специфичность к антимикробным веществам других тест-систем может отличаться от указанной выше, данная информация должна содержаться в прилагаемом описании тест-систем.

IX.2. Определение метаболитов нитрофуранов методом подтверждающего анализа (на основе ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС и др.)

IX.2.1. Назначение и область применения

Определение остаточного содержания метаболитов нитрофурана проводится в молоке и молочных продуктах, яйцах и яичном порошке, мясе, мясных продуктах и продуктах из мяса птицы, мёде и креветках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием по ГОСТ 32014—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором».

Диапазон определяемых содержаний – 1,0—1 000,0 мкг/кг.

IX.2.2. Особенности и условия применения метода ВЭЖХ-МС

Особенностью применения метода ВЭЖХ-МС в данном случае является то, что метод может обеспечить надежное определение метаболитов нитрофуранов на уровнях, близких к уровням МДУ. Это связано с тем, что в отличие от пищевого сырья, представляющего потенциальную опасность по содержанию метаболитов нитрофуранов, конечная продукция содержит в большинстве случаев продукцию животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства в разбавленном виде. Практически единственным исключением является ряд молочных продуктов. В ситуации разбавления пищевого сырья – потенциального источника антибиотиков, метод определения, представленный в ГОСТ 32014—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» является качественным, подтверждающим присутствие метаболитов нитрофуранов, обнаруженных методом ИФА, в пробе.

Условия применения метода по ГОСТ 32014—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» в качестве подтверждающего:

1. Обнаружение содержания метаболитов нитрофуранов в пробе пищевого продукта на уровне МДУ, выше уровня МДУ и ниже уровня МДУ. При этом в расчёт берется ошибка метода определения ИФА. В случае присутствия антибиотиков в пробе продукта в количествах ниже МДУ, но если определенное количество в интервале ошибки метода оп-

ределения равно или выше МДУ, необходимо проведение подтверждения присутствия антибиотика методом ВЭЖХ-МС.

2. Идентификация присутствия метаболитов нитрофуранов проводится без использования внутреннего стандарта (ввиду отсутствия необходимости проведения количественного анализа).

3. Идентификация присутствия метаболитов нитрофуранов проводится как по совпадению времени удерживания (совпадающего со временем удерживания стандарта при одинаковых условиях хроматографирования), так и по совпадению молекулярного и дочерних ионов, полученных масс-спектрометрией элюата.

4. Возможно дополнительное подтверждение присутствия метаболитов нитрофуранов в продукте «методом добавки». Метод заключается в предварительном внесении в пробу, в которой присутствуют метаболиты нитрофуранов, определенные методом ИФА, дополнительного количества метаболитов нитрофуранов. При этом при хроматографировании пробы должны наблюдаться совпадения времен удерживания пиков метаболитов нитрофуранов пробы и метаболитов нитрофуранов добавки, что выражается в следующем: отсутствие дополнительных вершин пиков (расщепление), отсутствие каких-либо изменений формы пиков.

Отмечаем, что проведение подтверждения «методом добавки» является дополняющим, т. е. пункт 4 только дополняет пункты 2—3 и проводится после выполнения идентификации по пунктам 2—3.

Метод по ГОСТ 32014—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» может быть использован для подтверждения присутствия или отсутствия метаболитов нитрофуранов в случае внутреннего контроля содержания метаболитов нитрофуранов на предприятии (при входном контроле продуктов переработки животноводства, рыболовства, пчеловодства, птицеводства). При этом объектом контроля служат продукты переработки, не являющиеся продукцией, предназначенной для реализации населению.

IX.2.3. Критерии оценки результатов

Критерии оценки:

1. **Присутствие** метаболитов нитрофуранов в исследованной пробе **считается подтвержденным**, если выполнены следующие критерии:

а) обнаруженные вещества в составе образца совпадают как по времени удерживания, так и по молекулярным и дочерним ионам со срав-

нительными величинами, полученными при хроматографическом разделении и масс-спектрометрии стандартов метаболитов нитрофуранов;

б) соотношение сигнал/шум полученных пиков определяемых метаболитов нитрофуранов в хроматограмме составляет 3 и более.

2. **Отсутствие** метаболитов нитрофуранов в исследуемой пробе **считается подтвержденным** в случае невыполнения критериев а), б).

Возможна дополнительная идентификация «методом добавки».

IX.2.4. Сведения о метрологической аттестации используемого метода

Данные о метрологической аттестации метода по ГОСТ 32014—12 «Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором»:

– Номер в реестре сведений об аттестованных методиках (методах) измерений ФР.1.31.2010.06904.

– Свидетельство – № 54-09 от 20.10.2009.

Приложение для всех разделов

Пересчёт относительного центробежного ускорения в скорость центрифугирования

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

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

$$F = 11{,}18 \cdot r \cdot (n^2/1\,000)^2, \text{ где} \quad (1)$$

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:

$$n = 1\,000 \cdot \sqrt{\frac{F}{11{,}18 \cdot r}} \quad (2)$$

Для облегчения расчёта 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) 4 000 g, если средний радиус вращения столбика жидкости в центрифужной пробирке равен 8 см.

Способ 1 – путём расчёта по формуле (2):

$$n = 1\,000 \cdot \sqrt{\frac{4\,000}{11{,}18 \cdot 8}} = 6\,687$$

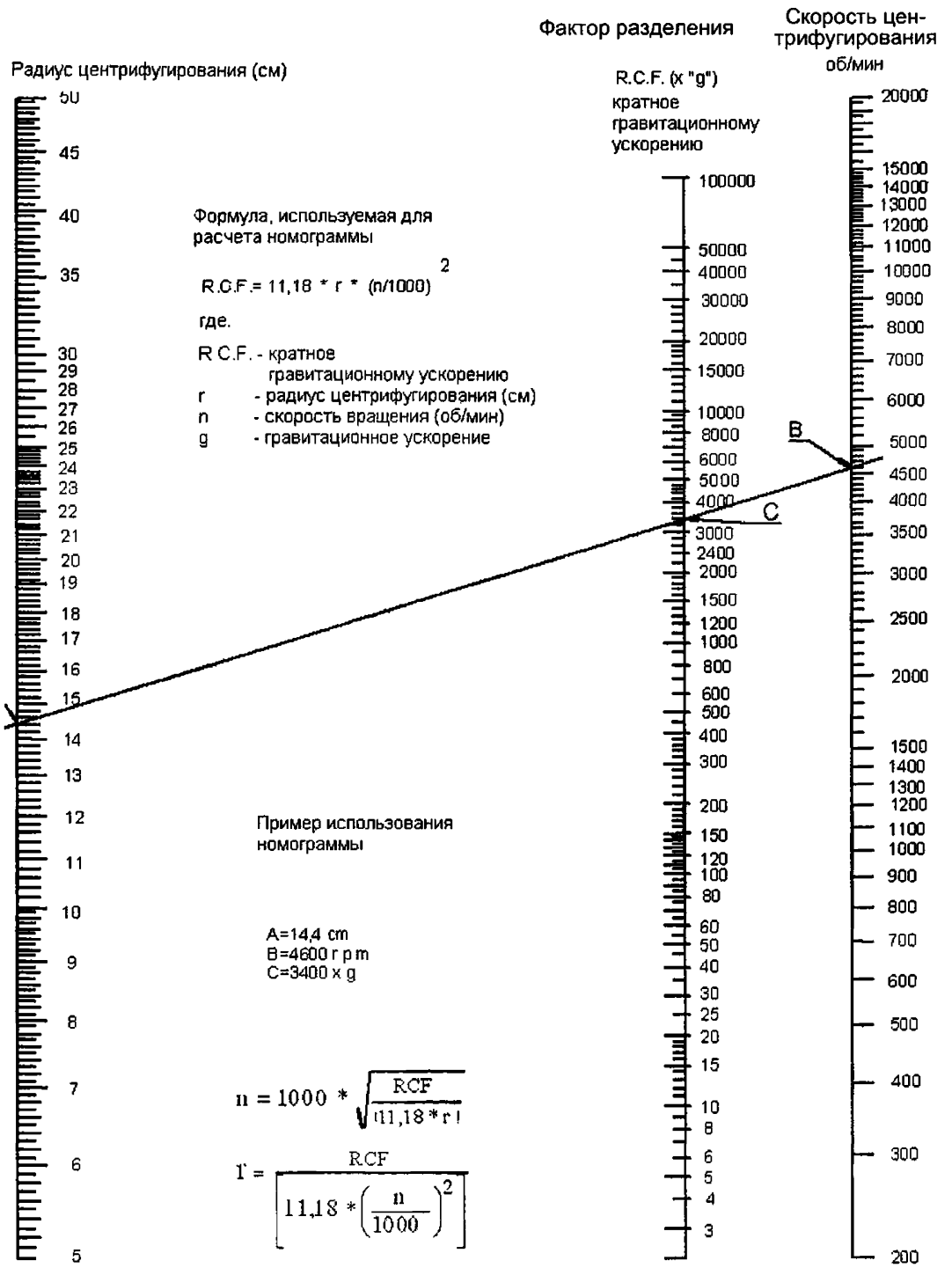
Таким образом, для получения фактора разделения 4 000 g необходимо установить скорость центрифугирования примерно 6 700 об./мин.

Способ 2 – с использованием номограммы.

Проводим прямую линию через точку 8 на шкале «Радиус центрифугирования» и точку 4 000 на шкале «Фактор разделения RFS» до пересечения со шкалой «Скорость центрифугирования», точка пересечения с которой определяет скорость центрифугирования – примерно 6 700 об./мин.

Необходимо отметить, что средний радиус будет меняться в зависимости от высоты столбика жидкости в центрифужной пробирке.

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



УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Просим Вас учесть следующие изменения в МУК 4.1.3535—18:

Стр.	Абзац	Напечатано	Следует читать
23	7	Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в **1 см^3** моющего буфера……	Если жирного остатка не наблюдается, то растворяют сухой остаток в **0,5 см^3** моющего буфера …
29	5	… и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение **1 часа** в темном месте.	… и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение **0,5 часа** в темном месте.

gost.e-ecolog.ru