Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств бацитрацина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа

Методические указания
МУК 4.1.3379—16

Издание официальное

Москва • 2016

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 бацитрацина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа

Методические указания
МУК 4.1.3379—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств бацитрацина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—12 с.

ISBN 978—5—7508—1526—5

1. Разработаны ФГБНУ «НИИ питания» (С. А. Хотимченко (руководитель), С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, Л. П. Минаева) при участии ООО «Системные решения Стай-лаб» (А. В. Галкин).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 20 мая 2016 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 8 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редакторы Л. С. Кучурова, К. В. Шмат
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 29.12.16

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75
Тираж 125 экз. Заказ 86

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2016
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
8 июля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств бацитрацина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа

Методические указания МУК 4.1.3379—16

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода определения (путем конкурентного иммуноферментного анализа с фотометрической детекцией при 450 нм) остаточных количеств бацитрацина в пищевых продуктах животного происхождения (нижний предел определения: в мясе скота и птицы, в продуктах из мяса и птицы – 0,009 мг/кг, в яйцах и яйцепродуктах – 0,011 мг/кг, в молоке и молочных продуктах – 0,011 мг/кг). Методика также может быть использована для анализа бацитрацина в кормах для животных (нижний предел определения: 0,092 мг/кг).

1.2. Методические указания предназначены для специалистов лабораторий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также иных организаций и учреждений, занимающихся вопросами оценки качества и безопасности пищевых продуктов, аккредитованных на проведение соответствующих исследований в установленном порядке.

1.3. Методические указания могут быть использованы в организациях, осуществляющих производственный контроль продовольственного сырья и пищевых продуктов животного происхождения.

1.4. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Метод измерений

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 + конъюгат бацитрацина с ферментом или подготовленная проба продукта + конъюгат бацитрацина с ферментом), свободный бацитрацин и конъюгат бацитрацина конкурируют за центры связывания антител к бацитрацину. Несвязавшийся конъюгат удаляется в процессе промывки. После добавления в лунки раствора субстрата/хромогена фермент в составе связавшегося с антителами к бацитрацину конъюгата 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). Расчет содержания бацитрацина проводят по стандартной кривой или с помощью специального программного обеспечения.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства

3.1. Средства измерений

Автоматические пипеточные дозаторы с одноразовыми наконечниками с диапазоном объема доз от 0,005 до 0,05 $см^3$, от 0,02 до 0,2 $см^3$, от 0,2 до 1,0 $см^3$ и восьмиканальные дозаторы с диапазоном объема доз 0,05—0,3 $см^3$ с наконечниками

Весы лабораторные аналитические 120 г / 0,001 мг

Весы лабораторные общего назначения 2-го и 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г

Микропланшетный иммуноферментный анализатор (планшетный фотометр, ридер) с диапазоном линейности измерения оптической плотности 0—2,5 и светофильтром на 450 нм

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

Цилиндры мерные, стаканы химические и колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 200, 250, 500 $см^3$

Градуированные пипетки 2-го класса точности вместимостью 1 и 10 $см^3$

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

3.2. Вспомогательные устройства

Центрифуга настольная (эффективность не менее 2 000 g)

Ротатор (встряхиватель осевой)

Шейкер лабораторный для пробирок типа Вортекс

Гомогенизатор перистальтического типа со стерильными пластиковыми пакетами (или других видов, или фарфоровые ступки с пестиками)

Холодильник бытовой электрический

Конические колбы на 100 $см^3$ ГОСТ 23932—90

Пластиковые центрифужные пробирки (виалы) с закручивающимися крышками объемом 15 $см^3$

Шкаф (стол) лабораторный с вытяжным устройством

Программное обеспечение для обработки результатов ИФА

Примечание. Допускается использование вспомогательных устройств с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Реактивы

Вода дистиллированная деминерализованная

Метанол, хч ГОСТ 6995—77

Раствор гидроокиси натрия 0,1 М (для нейтрализации образцов молока)

Наборы для количественного определения бацитрацина по технологии ИФА на 96 определений с внутренним стандартом, включающие следующие компоненты[1]:

[1] Хранение набора осуществляют в соответствии с инструкцией изготовителя, замена компонентов одного набора на компоненты аналогичного назначения из другого набора не допускается.

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 мкг/кг (нулевой стандарт), 0,000625; 0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01 и 0,02 мг/кг бацитрацина в воде);
3) конъюгат бацитрацина с пероксидазой, концентрат (× 100);
4) готовая смесь субстрата с хромогеном;
5) стоп-реагент (1 н серная кислота);
6) буфер для разбавления проб, готовый к употреблению;
7) буфер для разбавления конъюгата, готовый к употреблению;
8) буфер для промывки, концентрат (× 30)

Примечание. Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

4. Требования к безопасности и квалификации операторов

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

4.2. 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.

4.3. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83.

4.4. 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. Подготовка к исследованию

5.1. Хранение наборов и реагентов.

Набор хранят при температуре 2—8 °С, не допуская подмораживания компонентов. После отделения необходимого количества стрипов/лунок неиспользуемые стрипы/лунки необходимо поместить обратно в оригинальную упаковку из фольги и плотно укупорить вместе с прилагаемым влагопоглотителем. Продолжать хранение набора в холодильнике при 2—8 °С.

5.2. 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.

Перед использованием тест-набора доводят температуру всех реагентов до комнатной (20—25 °С) в течение 1,5—2 ч. Если в концентратах буфера и конъюгата образовались кристаллы, нужно растворить их путем встряхивания при комнатной температуре перед разведением этих реагентов.

5.3. Приготовление растворов.

5.3.1. 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 (например, к 8 $см^3$ метанола прибавляют 2 $см^3$ буфера для разбавления проб; данный объем достаточен для экстракции 5 проб).

5.3.2. С целью приготовления буфера для промывки исходный концентрированный раствор буфера разбавляют в 20 раз деминерализованной водой в соотношении 1 : 19 (например, к 2 $см^3$ концентрата прибавляют 38 $см^3$ деминерализованной воды).

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.

5.3.3. Для приготовления раствора конъюгата бацитрацина с пероксидазой необходимо отцентрифугировать флакон (виалу) с концентратом в течение 1 минуты 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 объем достаточен для 4 стрипов).

6. Подготовка проб

Отбор проб проводят с учетом требований нормативно-технической документации на конкретный вид пищевого продукта. Подготовку проб к ИФА осуществляют с применением аппаратуры и материалов, указанных в межгосударственных и национальных стандартах на методы подготовки проб к проведению физико-химических анализов.

До начала анализа пробы хранят в холодильнике.

6.1. Подготовка проб мяса и мясопродуктов, яиц, кормов

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документации на продукт).

Пробы тщательно гомогенизируют в гомогенизаторе или вручную в фарфоровой ступке. Добавляют 2 см^3 80%-го раствора метанола в буфере для проб к 1 г гомогенизированной пробы, встряхивают на ротаторе в течение 15 мин, переворачивая пробирку, центрифугируют при 2 000 g в течение 10 минут при комнатной температуре (20—25 °С).

Супернатант проб мяса и яиц разбавляют в 5 раз (соотношение 1 : 4) буфером для разбавления проб (например, к 0,04 см^3 супернатанта добавляют 0,16 см^3 буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе.

Супернатант проб кормов разбавляют в 20 раз (соотношение 1 : 19) буфером для разбавления проб (например, к 0,01 см^3 супернатанта добавляют 0,19 см^3 буфера для разбавления проб), перемешивают на вортексе.

Для дальнейшего анализа используют по 0,05 см^3 полученных вышеописанным образом растворов.

6.2. Подготовка проб молока и молокопродуктов

Образцы продуктов в сухом виде предварительно восстанавливают в воде в соответствии с указанием на этикетке (нормативно-технической документации на продукт).

Пробы нейтрализуют с помощью 0,1 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 60 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 (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 $см^3$ полученного раствора.

7. Проведение исследований

7.1. 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 или раствора подготовленной пробы продукта, после чего в каждую лунку добавляют по 0,05 $см^3$ разбавленного конъюгата. Смесь перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 1 ч в темном месте.

3. По окончании инкубации жидкость выливают из лунок, переворачивая рамку планшета, и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Лунки заполняют буфером для промывки, приготовленным по п. 5.3.2, 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. Смесь перемешивают, осторожно покачивая планшет рукой, и оставляют для инкубации при комнатной температуре (20—25 °С) в течение 30 мин в темном месте.

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

7.2. Учет и обработка результатов

7.2.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на микропланшетном иммуноферментном анализаторе (планшетном фотометре, ридере) при длине волны 450 нм против нулевого стандарта, значение которого принимается за 100 %.

Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, ниже 0,6 ($А_{450нм} < 0,6$), это 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.

7.2.2. Вычисляют средние значения оптической плотности стандартных и исследуемых растворов, полученные по 2 параллельным микролункам в результате двух параллельных определений. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

Вычисленные средние значения оптической плотности стандартных (или исследуемых) растворов делят на вычисленное среднее значение оптической плотности нулевого стандарта и умножают на 100 % по формуле:

$$ОП = \frac{ОП_i}{ОП_0} \times 100, \text{ где} \qquad (1)$$

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

$ОП_i$ – среднее значение оптической плотности стандартных растворов бацитрацина (или исследуемых растворов продуктов), ед.;

$ОП_0$ – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта, ед.

7.2.3. По величинам значений относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим им значениям концентрации бацитрацина в мкг/кг строят калибровочную кривую в полулогарифмической системе координат.

7.2.4. Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение.

При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и рекомендациями разработчика.

7.2.5. Концентрацию бацитрацина в мкг/кг считывают по калибровочной кривой в соответствии со значением оптической плотности, вычисленным по формуле (1).

7.2.6. Для того, чтобы вычислить содержание бацитрацина в исследуемом продукте, величину концентрации в мкг/кг, полученную по ка-

либровочной кривой, умножают на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

– молоко – × 10;
– мясо – × 15;
– яйца – × 15;
– корма – × 40.

При необходимости расчета содержания бацитрацина в исходном сухом продукте полученную величину необходимо разделить на кратность разведения при восстановлении пробы в воде; при переводе значений, выраженных в мкг/кг продукта, в значения, выраженные в мг/кг, – разделить полученное значение на 1 000.

8. Метрологические характеристики

8.1. Метрологические характеристики метода определения остаточных количеств бацитрацина в продуктах питания животного происхождения, проводимого в полном соответствии с приведенной процедурой твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа, представлены в таблице.

Таблица

Статистический параметр	Вид продукта			
	мясо	яйца	молоко	корма
Нижний предел определения, мг/кг	0,009	0,011	0,011	0,092
Интервал надежного определения, мг/кг	0,009—0,3	0,011—0,3	0,011—0,2	0,092—0,8
Среднее значение открываемости (степень извлечения), %	122	110	99	97
Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений, полученными в одной лаборатории в одной серии измерений (сходимость), при $P = 0,95$ не должно превышать, %	15,0			
Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений, выполненных в двух разных лабораториях (воспроизводимость), при $P = 0,95$ не должно превышать по отношению к среднему, %	35,0			

8.2. В случае получения результатов ниже предела определения следует указывать результат со знаком «<»: например, «содержание бацитрацина в яйцах < 0,011 мг/кг».

8.3. Если расхождение результатов двух параллельных определений (сходимость и воспроизводимость) превышает требования таблицы, то повторно проводят два новых параллельных определения.

8.4. При количественном определении содержания бацитрацина в исследуемом продукте необходимо подтверждение полученного результата с использованием любого другого метрологически аттестованного или стандартизованного метода определения.

gost.e-ecolog.ru