
МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
33634—
2015

**ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ,
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ**

**Иммуноферментный метод определения
остаточного содержания антибиотиков
фторхинолонового ряда**

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2016

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 октября 2015 г. № 81-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 января 2016 г. № 6-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33634—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартиформ, 2016

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

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины, определения и сокращения	2
4 Сущность метода	2
5 Метрологические характеристики	2
6 Требования безопасности и условия выполнения измерений	3
7 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы	3
8 Подготовка к выполнению измерений	4
8.1 Подготовка оборудования	4
8.2 Приготовление растворов	4
8.3 Отбор проб	5
8.4 Подготовка проб	5
9 Проведение иммуноферментного анализа	6
9.1 Общие положения	6
9.2 Подготовка тест-системы к проведению анализа	6
9.3 Проведение испытания	7
10 Обработка результатов измерения	7
11 Контроль точности результатов измерения	8
Приложение А (рекомендуемое) Комплектация тест-системы «Фторхинолоны ИФА»	9
Приложение Б (рекомендуемое) Схема заполнения лунок планшета	10
Приложение В (рекомендуемое) Таблица для записи результатов измерения	11

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Иммуноферментный метод определения остаточного содержания антибиотиков
фторхинолонового ряда

Food products, food raw materials. Immunoenzymatic method for determination of fluoroquinolones residual content

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясо, мясо птицы, яйца, яичный меланж, яичный порошок, молоко и устанавливает иммуноферментный метод определения остаточного содержания антибиотиков фторхинолонового ряда (энрофлоксацина, ципрофлоксацина, норфлоксацина и офлоксацина) в диапазоне измерений от 5 до 1280 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79¹⁾ Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 334—73 Бумага масштабнo-координатная. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2652—78 Реактивы. Калия бихромат технический. Технические условия

ГОСТ 4172—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроксид. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2003²⁾ Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

¹⁾ В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

²⁾ В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

- ГОСТ 6552—80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия
ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 7269—79 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 26809—86 Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу
ГОСТ 31467—2012 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытанию

П р и м е ч а н и е — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по указателю «Национальные стандарты», составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

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

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

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

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

- ИФА — иммуноферментный анализ;
ОП — оптическая плотность;
АГ — антиген;
АТ — антитела;
ФК — ферментный конъюгат;
П — относительное поглощение.

4 Сущность метода

4.1 Иммуноферментный метод основан на измерении содержания фторхинолонов в растворах экстрактов исследуемых проб с помощью непрямого твердофазного конкурентного ИФА.

4.2 Непрямой твердофазный конкурентный ИФА основан на способности антибиотиков фторхинолонового ряда взаимодействовать со специфическими АТ, полученными к энрофлоксацину, в условиях конкуренции с белковым конъюгатом энрофлоксацина, нанесенным на поверхность лунок планшета, — твердофазным АГ.

4.3 Связавшиеся с твердой фазой АТ взаимодействуют с вторичными антивидами АТ, мечеными пероксидазой хрена, которые выявляют путем измерения интенсивности окрашивания продукта реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (раствор № 11, см. приложение А) перекисью водорода.

Аналитический сигнал (регистрируемое значение ОП), характеризующий степень взаимодействия АТ с АГ, обратно пропорционален массовой концентрации фторхинолонов в исследуемом растворе.

5 Метрологические характеристики

5.1 Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает определение содержания антибиотиков фторхинолонового ряда с расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата $k = 2$, указанной в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 — Метрологические характеристики

Содержание фторхинолонов	Диапазон измерений содержания, мкг/дм ³ (мкг/кг)	Значение относительной расширенной неопределенности U , при коэффициенте охвата $k = 2$, $P = 0,95$, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_p , %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R , %	Предел повторяемости r , % (при $P = 0,95$, $n = 2$)
В мясе, мясе птицы, яйцах, яичном порошке, яичном меланже, молоке	5—1280	75	13	35	36

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

Т а б л и ц а 2 — Специфичность АТ, применяемых для определения массовой концентрации фторхинолонов

Фторхинолон	Коэффициент перекрестного реагирования, %
Энрофлоксацин	100
Ципрофлоксацин	100
Норфлоксацин	60
Офлоксацин	20

6 Требования безопасности и условия выполнения измерений

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

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

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

6.4 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

7 Средства измерений, аппаратура, материалы, посуда и реактивы

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

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с наибольшим пределом взвешивания не более 150 г и пределом допускаемой абсолютной погрешности $\pm 0,05$ г;
- весы микроаналитические с наибольшим пределом взвешивания 52 г, с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более $\pm 0,01$ мг;
- калькулятор любого типа с логарифмической функцией;
- рН-метр любой марки, позволяющий проводить измерения в диапазоне от 3 до 10 ед. рН с погрешностью $\pm 0,05$ ед. рН;
- фотометр вертикального типа фотометрирования с диапазоном измерений ОП от 0 до 3 в комплекте с интерференционными светофильтрами для длин волн 450 и 620 нм;

- измельчитель-гомогенизатор лабораторный;
- морозильную камеру любого типа, обеспечивающую среднюю температуру в холодильной камере не выше минус 20 °С;
- роторный испаритель любого типа или устройство для испарения экстрактов, термостатируемый нагревательный модуль с системой отдувки растворителей инертным газом;
- термостат любого типа, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 8 °С;
- центрифугу с бакет-ротором и адаптером для пробирок вместимостью 15 см³, частотой вращения не менее 4000 об/мин;
- шейкер вихревого типа, с вставкой для одной пробирки и диапазоном скорости от 150 до 2500 об/мин;
- шейкер переворачивающий вертикального вращения 360° в одной плоскости с адаптером для пробирок и диапазоном скорости от 20 до 100 об/мин;
- шкаф сушильный любого типа, обеспечивающий поддержание температуры не менее (95 ± 5) °С;
- бумагу масштабнo-координатную по ГОСТ 334, марки Н-1;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- колбы 1-10(100, 1000)-2 по ГОСТ 1770;
- колбу типа Кн-1-50-24/29 ТС по ГОСТ 25336;
- пипетки многоканальные переменной вместимости 0,03—0,3 см³, с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ±1,0 %;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 20—100 мм³, 200—1000 мм³, 500—5000 мм³ с допустимой относительной погрешностью дозирования по метанолу и ацетонитрилу не более ±1 %;
- пробирки полипропиленовые вместимостью 15 см³ с завинчивающимися крышками;
- пробирки типа П-1-10-0,1 ХС по ГОСТ 25336;
- пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 см³;
- цилиндры 1(2,3)-100(250)-1 по ГОСТ 1770.

7.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы:

- ацетонитрил для хроматографии, о. с. ч., с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- гексан с содержанием основного вещества не менее 98 %, х. ч.;
- дихлорметан для газовой хроматографии с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- калия бихромат по ГОСТ 2652;
- кислоту ортофосфорную по ГОСТ 6552, концентрированную, х. ч.;
- кислоту серную по ГОСТ 4204, концентрированную;
- натрия гидроксид по ГОСТ 4328, х. ч.;
- натрия гидрофосфат безводный, х. ч., по ГОСТ 4172;
- натрия дигидрофосфат 2-водный, ч. д. а., по ГОСТ 245;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.;
- тест-систему для непрямого твердофазного конкурентного ИФА, укомплектованную в соответствии с приложением А.

8 Подготовка к выполнению измерений

8.1 Подготовка оборудования

8.1.1 При подготовке к проведению измерений лабораторную стеклянную посуду моют смесью водного раствора бихромата калия с концентрированной серной кислотой, многократно промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу.

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

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление раствора фосфорной кислоты молярной концентрацией 1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 50 см³ дистиллированной воды и осторожно приливают 12 см³ концентрированной фосфорной кислоты, доводят объем раствора дистиллированной водой до метки, закрывают пробкой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в вытяжном шкафу при комнатной температуре — не более 1 мес.

8.2.2 Приготовление фосфатного буферного раствора молярной концентрацией 0,067 моль/дм³ и рН 7,2

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 7,67 г безводного гидрофосфата натрия, 2,02 г 2-водного дигидрофосфата натрия и 8,7 г хлорида натрия, растворяют в 500 см³ дистиллированной воды. Измеряют рН, устанавливают его значение до $7,2 \pm 0,2$, осторожно по каплям прибавляя раствор фосфорной кислоты (см. 8.2.1) и постоянно перемешивая. Затем объем в колбе доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора при температуре 4 °С — не более 1 мес.

8.2.3 Приготовление раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 0,4 г гидроксида натрия, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 1 мес.

8.2.4 Приготовление рабочего буферного раствора

В мерную колбу вместимостью 10 см³ приливают до метки раствор № 10 (см. приложение А), добавляют 28 мм³ раствора № 13 (см. приложение А), перемешивают и закрывают притертой пробкой.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.2.5 Приготовление смеси ацетонитрила и раствора гидроксида натрия молярной концентрацией 0,1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 90 см³ ацетонитрила и доводят до метки раствором гидроксида натрия (см. 8.2.3). Колбу закрывают пробкой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре в вытяжном шкафу — 2 сут.

8.2.6 Приготовление рабочих градуировочных растворов K₀—K₅

Для приготовления рабочего разведения градуировочных растворов K₀—K₅ в пробирки типа «Эппендорф», маркированные K₀, K₁, K₂, K₃, K₄ и K₅, вносят по 0,27 см³ рабочего буферного раствора (см. 8.2.4) и по 0,03 см³ реактивов № 3—№ 8 (см. приложение А), соответственно маркировке. Перемешивают, в результате получают растворы со следующими концентрациями энрофлоксацина: K₀—0 мкг/см³; K₁—0,5 мкг/см³; K₂—2,0 мкг/см³; K₃—8,0 мкг/см³; K₄—32,0 мкг/см³; K₅—128,0 мкг/см³. Используют свежеприготовленные растворы.

Концентрированные градуировочные растворы после вскрытия флаконов хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.

8.2.7 Приготовление рабочего раствора буфера для промывки

В колбу вместимостью 50 см³ вносят 47,5 см³ дистиллированной воды, добавляют 2,5 см³ реактива № 2 (см. приложение А), перемешивают.

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

8.2.8 Приготовление рабочего раствора ферментного конъюгата

В стеклянную пробирку вносят 2,25 см³ реактива № 10 (см. приложение А) и 0,25 см³ реактива № 9 (см. приложение А), перемешивают.

Используют свежеприготовленный раствор.

8.3 Отбор проб

8.3.1 Отбор проб мяса и мясных продуктов — по ГОСТ 7269.

8.3.2 Отбор проб мяса птицы — по ГОСТ 31467.

8.3.3 Отбор проб молока — по ГОСТ 26809.

8.3.4 Отбор проб яиц, яичного меланжа и яичного порошка проводят по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

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

8.4 Подготовка проб

8.4.1 Подготовка проб мяса, мяса птицы, яиц, яичного меланжа, яичного порошка

Яйца отделяют от скорлупы и перемешивают на гомогенизаторе. Яичный меланж, яичный порошок тщательно перемешивают.

Мышечную ткань предварительно очищают от жира, грубой соединительной ткани и измельчают на гомогенизаторе. Далее обработку пробы проводят в соответствии с рисунком 1.

2,00 г гомогенизированной пробы помещают в полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см ³ . Вносят 8 см ³ смеси ацетонитрила и раствора натрия гидроксида (см. 8.2.5), перемешивают в течение 2 мин на шейкере вихревого типа, после чего перемешивают на переворачивающем шейкере в течение 10 мин
↓
Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 15 °С
↓
3 см ³ надосадочной жидкости переносят в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см ³ , добавляют 3,0 см ³ фосфатного буферного раствора (см. 8.2.2) и 6 см ³ дихлорметана. Перемешивают на переворачивающем шейкере в течение 10 мин
↓
Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 15 °С
↓
Удаляют верхний водный слой и промежуточную фазу. Переносят 3 см ³ нижнего органического слоя в новую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см ³ и упаривают досуха в токе азота в системе упаривания при температуре 50 °С
↓
К сухому остатку добавляют 0,3 см ³ раствора № 3 (см. приложение А) и тщательно перемешивают на шейкере вихревого типа до полного растворения
↓
Полученный экстракт обезжиривают. Для этого приливают 0,3 см ³ гексана и центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин при температуре 15 °С. Удаляют верхний гексановый слой. Процедуру обезжиривания повторяют еще раз
↓
В пробирку типа «Эппендорф» отбирают 0,03 см ³ обезжиренного экстракта, добавляют 0,27 см ³ рабочего буферного раствора (см. 8.2.4), перемешивают и используют для проведения ИФА в соответствии с разделом 9

Рисунок 1 — Обработка испытуемых проб

8.4.2 Подготовка проб молока

Отобранную пробу молока перед анализом тщательно перемешивают.

В полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³ вносят 2 см³ пробы, 8 см³ смеси ацетонитрила и раствора натрия гидроксида (см. 8.2.5), гомогенизируют в течение 2 мин, после чего перемешивают на шейкере вихревого типа в течение 10 мин. Далее процедуру экстракции и обезжиривания пробы проводят согласно рисунку 1.

9 Проведение иммуноферментного анализа

9.1 Общие положения

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

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

9.1.3 Окрашивание раствора субстрата № 11 (см. приложение А) является признаком его порчи и делает невозможным его применение для анализа.

9.2 Подготовка тест-системы к проведению анализа

9.2.1 Перед использованием тест-систему вынимают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин, после чего аккуратно встряхивают каждый флакон. Реактив № 2 (см. приложение А) необходимо прогреть в сушильном шкафу при температуре 37 °С до полного растворения кристаллов солей и тщательно перемешать.

9.2.2 После использования, реагенты тест-системы сразу помещают в холодильник.

9.2.3 На всех стадиях необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

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

9.2.5 Каждый исследуемый рабочий раствор экстрактов испытуемых проб анализируют в двух повторностях.

Примечание — Далее приведены расходы реактивов на два стрипа¹⁾, что достаточно для анализа двух исследуемых проб. Для другого числа проб количество используемых стрипов и смешиваемых объемов реагентов изменяют в соответствии с количеством исследуемых проб.

9.3 Проведение испытания

9.3.1 Из планшета извлекают необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы хранят в закрытом фольгированном полиэтиленовом пакете с зип-локом²⁾ при температуре от 2 °С до 8 °С в течение срока годности тест-системы.

9.3.2 В лунки планшета вносят по 0,05 см³ рабочих градуировочных растворов (8.2.6) и по 0,05 см³ растворов экстрактов испытуемых проб.

Каждый раствор вносят в двойной повторности (лунки-дубли).

Внесение растворов проводят согласно приложению Б.

Далее в каждую лунку вносят по 0,05 см³ раствора № 1 (см. приложение А). Стрипы заклеивают пленкой или закрывают крышкой, инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч, после чего содержимое лунок сливают.

9.3.3 В лунки планшета вносят по 0,2 см³ раствора буфера для промывки (см. 8.2.7), оставляют на 1—2 мин и сливают. Процедуру промывки повторяют еще три раза. Остатки жидкости интенсивно стряхивают на чистую фильтровальную бумагу.

9.3.4 В лунки планшета вносят по 0,1 см³ раствора ферментного конъюгата (см. 8.2.8), заклеивают пленкой или закрывают крышкой, инкубируют в термостате при температуре 37 °С 1 ч и отмывают, как указано в 9.3.3.

9.3.5 В лунки планшета вносят по 0,1 см³ раствора № 11 (см. приложение А) и инкубируют при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин. Добавляют 0,1 см³ раствора № 12 (см. приложение А) и аккуратно перемешивают легким постукиванием по ребру планшета. Помещают планшет в вертикальный фотометр и измеряют значения ОП при длине волны 450 нм.

Запись результатов проводят согласно приложению В.

10 Обработка результатов измерения

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

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

$$П = \frac{ОП_n}{ОП_k} \cdot 100, \quad (1)$$

где ОП_n — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочными растворами энрофлоксацина К₁—К₅ (см. 8.2.6) или рабочими растворами экстрактов испытуемых проб;

ОП_k — среднее значение ОП, измеренной в лунках с градуировочным раствором К₀ (см. 8.2.6).

По значениям процентов связывания, вычисленным для градуировочных растворов и соответствующим известным значениям массовой концентрации энрофлоксацина (мкг/дм³), строят градуировочный график в полулогарифмической системе координат.

10.2 Для построения градуировочного графика используют масштабную-координатную бумагу. На ось абсцисс наносят значения логарифмов концентраций энрофлоксацина в рабочих разведениях градуировочных растворов (см. 8.2.6). По оси ординат откладывают значения процентов связывания, рассчитанные для массовых концентраций по формуле (1), и строят градуировочный график с использованием линейной зависимости.

¹⁾ Стрип — полоска из восьми лунок.

²⁾ Зип-лок — замок, обеспечивающий герметизацию пакета.

10.3 С помощью градуировочного графика по значению процента связывания, полученного для рабочих растворов экстрактов испытуемых проб, находят логарифм массовой концентрации фторхинолонов. С помощью калькулятора вычисляют его обратное значение (антилогарифм), соответствующее массовой концентрации определяемого фторхинолона в растворе экстракта. После чего рассчитывают содержание фторхинолонов в пробе C , мкг/дм³ (мкг/кг), по формуле

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

где c — массовая концентрация фторхинолонов в рабочем растворе экстракта испытуемой пробы, определяемая по градуировочному графику, мкг/дм³;

K — коэффициент пересчета мкг/дм³ в рабочем растворе экстракта испытуемой пробы в мкг/дм³ (мкг/кг),

учитывающий как разведение, так и степень извлечения фторхинолонов и равный 10.

Результаты измерений массовой концентрации (содержания) фторхинолонов C , мкг/дм³ (мкг/кг), округляют до целого числа.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое двух измерений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$|C_1 - C_2| \leq 0,01 \cdot C_{\text{ср}} \cdot r, \quad (3)$$

где C_1 и C_2 — результаты определений содержания фторхинолонов, полученные в условиях повторяемости, мкг/кг;

$C_{\text{ср}}$ — среднеарифметическое результатов двух определений содержания фторхинолонов в пробе, мкг/кг;

r — предел повторяемости, %, (см. таблицу 1).

10.4 Допускается использование программного обеспечения, позволяющего определять содержание фторхинолонов в пробе по средним значениям ОП, измеренным в лунках с градуировочными растворами и рабочими растворами экстрактов испытуемых проб.

11 Контроль точности результатов измерения

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости) и воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (раздел 5).

Относительное расхождение между результатами, полученными в разных лабораториях, не должно превышать относительного стандартного отклонения воспроизводимости (см. таблицу 1).

Приложение А
(рекомендуемое)

Комплектация тест-системы¹⁾ «Фторхинолоны ИФА»

В комплектацию тест-системы входят:

Планшет 96-луночный полистироловый стрипованный для иммунологических исследований, сенсibilизированный антигеном;

Пакет полиэтиленовый фольгированный с zip-локом.

Пленка полиэтиленовая самоклеющаяся для заклеивания планшетов.

Растворы:

№ 1 — АТ — антитела к энрофлоксацину;

№ 2 — раствор фосфатного буфера для промывки с добавлением твина-20 (20-кратный концентрат), рН (7,0—7,4).

№ 3 — буфер для экстракции;

№ 4 — К₁, № 5 — К₂, № 6 — К₃, № 7 — К₄, № 8 — К₅ — градуировочные растворы с известным содержанием (мкг/дм³) энрофлоксацина;

№ 9 — ФК — конъюгат антител против IgG (H + L) кролика с пероксидазой хрена (10-кратный концентрат);

№ 10 — реакционный буферный раствор с добавлением твина-20 и бычьего сывороточного альбумина, рН 7,0—7,4, стерильный;

№ 11 — раствор субстрата на основе 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина с добавлением перекиси водорода;

№ 12 — стоп-реагент, раствор серной кислоты молярной концентрацией 0,5 моль/дм³;

№ 13 — натрия ацетат, раствор молярной концентрацией 1,5 моль/дм³.

¹⁾ Данный комплект реагентов является рекомендуемым и приведен для удобства пользователей настоящего стандарта.

Приложение Б
(рекомендуемое)

Схема заполнения лунок планшета

Внесение реагентов следует проводить согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K ₀	K ₀	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11	№ 19	№ 19	№ 27	№ 27	№ 35	№ 35
B	K ₁	K ₁	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12	№ 20	№ 20	№ 28	№ 28	№ 36	№ 36
C	K ₂	K ₂	№ 5	№ 5	№ 13	№ 13	№ 21	№ 21	№ 29	№ 29	№ 37	№ 37
D	K ₃	K ₃	№ 6	№ 6	№ 14	№ 14	№ 22	№ 22	№ 30	№ 30	№ 38	№ 38
E	K ₄	K ₄	№ 7	№ 7	№ 15	№ 15	№ 23	№ 23	№ 31	№ 31	№ 39	№ 39
F	K ₅	K ₅	№ 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

Приложение В
(рекомендуемое)

Таблица для записи результатов измерения

Таблица В.1

Маркировка варианта	Значение ОП		$\frac{ОП_n}{ОП_k} \cdot 100, \%$	lg C	Содержание фторхинолона	
	по лункам	среднее			в экстракте с, мкг/дм ³	в исследуемой пробе С, мкг/дм ³ (мкг/кг)
K ₀						
K ₁						
K ₂						
K ₃						
K ₄						
K ₅						
№ 1						
№ ...						
№ 42						

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, иммуноферментный метод, остаточное содержание, фторхинолоны, антибиотики фторхинолонового ряда, энрофлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, прецизионность метода, тест-система, антиген, антитела, оптическая плотность, ферментный конъюгат

Редактор *К.В. Дудко*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 18.02.2015. Подписано в печать 17.03.2016. Формат 60×84 $\frac{1}{8}$. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40. Тираж 35 экз. Зак. 773.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru