RIDASCREEN® Хлорамфеникол

Арт. No. R1511

Иммуноферментный метод для количественного определения хлорамфеникола в различных матрицах

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, обращайтесь по вопросам технической поддержки и дополнительной информации к официальным дистрибьюторам на территории Вашей страны:

Официальный дистрибьютор в России:
ООО "НеоТест"
ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 649 02 01
info@neo-test.ru
www.neo-test.ru

Техническая поддержка
support@neo-test.ru
+7 499 704 05 50

Официальный дистрибьютор в Беларуси:
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

Техническая поддержка
support@komprod.com
+375 17 336 50 54

RIDA® и RIDASCREEN®

являются зарегистрированными торговыми марками R-Biopharm AG.

Производитель: R-Biopharm AG, Дармштадт, Германия

R-Biopharm AG имеет сертификат ISO 9001.

RIDA® and RIDASCREEN®

are registered trademarks of R-Biopharm AG

Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

R-Biopharm AG is ISO 9001 certified.

RIDASCREEN® Хлорамфеникол

Описание

Набор RIDASCREEN® Chloramphenicol (Кат. No.: R1511) предназначен для количественного определения хлорамфеникола в молоке, молочном порошке, молочной продукции, меде и маточном молочке, рыбе, креветках, мясе, яйцах, моче (так же возможно определение хлорамфеникола глюкуронида), в сыворотке/плазме и в кормах методом конкурентного иммуноферментного анализа. Все необходимые для анализа реагенты, включая стандарты, входят в комплектацию набора. Набор предназначен для 96 определений (включая стандарты). Для проведения количественного анализа требуется микропланшетный ИФА-анализатор (ридер).

Пробоподготовка:	молоко: прямое использование, без пробоподготовки; молочный порошок: растворение, или, как альтернатива, преципитация, экстракция, выпаривание, растворение; йогурт, кефир, сливочное масло, сливки: преципитация, экстракция, выпаривание, растворение; творог, сметана: гомогенизация, обезжиривание, экстракция, обезжиривание, экстракция, выпаривание, растворение; масло: обезжиривание, экстракция, выпаривание, растворение; сыр: гомогенизация, экстракция, выпаривание, растворение; мёд: экстракция, выпаривание, растворение; маточное молочко: экстракция, выпаривание, растворение; мясо, рыба, креветки, яйца: гомогенизация, экстракция, выпаривание, растворение, обезжиривание; моча: прямое использование или гидролиз, экстракция, выпаривание, растворение; плазма / сыворотка: экстракция, выпаривание, растворение; корма: измельчение, экстракция, выпаривание, растворение, обезжиривание.
Время выполнения:	Подготовка проб (10 проб)……..……от 5 мин до 2 ч Выполнение теста (время инкубации)……45 мин
Предел обнаружения: (соответствует стандартному веществу)	Молоко……..ок. 24 нг/л сухое молоко (с растворением)……...ок. 240 нг/кг сухое молоко (с экстракцией)……ок. 24 нг/кг йогурт, кефир, сливочное масло, сливки…….ок. 12 нг/кг творог, сметана……ок. 15 нг/кг масло……ок. 61 нг/кг сыр……ок. 16 нг/кг

мёд……ок. 25 нг/кг
маточное молочко……ок. 23 нг/кг
мясо (говядина, свинина, птица)……..ок. 5 нг/кг
рыба……ок. 8 нг/кг
креветки……ок. 8 нг/кг
креветки……...ок. 34 нг/кг
яйца……..ок. 15 нг/кг
моча, прямое использование (ХАФ-глюкуронид)…..ок. 138 нг/л
моча, гидролизованная (хлорамфеникол)…….ок. 196 нг/л
плазма/сыворотка……..ок. 18 нг/л
корма……..ок. 107 нг/кг

Предел определения (CCβ):

Молоко……..ок. 75 нг/л
сухое молоко……ок. 100 нг/кг
йогурт, кефир, сливочное масло, сливки…….ок. 50 нг/кг
творог, сметана……ок. 300 нг/кг
масло……ок. 150 нг/кг
сыр……..ок. 200 нг/кг
мёд……ок. 50 нг/кг
маточное молочко……..ок. 100 нг/кг
мясо (говядина, свинина, птица)……..ок. 25 нг/кг
рыба……ок. 25 нг/кг
креветки……..ок. 25 нг/кг
креветки(пробоподготовка для определения нитрофуранов) ……ок. 150 нг/кг
яйца……..ок. 75 нг/кг
моча прямое использование (ХАФ-глюкуронид) ……..ок. 300 нг/кг
моча гидролизованная (хлорамфеникол) ……..ок. 325 нг/кг
плазма/сыворотка……...ок. 50 - 100 нг/кг
корма……..ок. 150 нг/кг

Степень извлечения: (в пересчёте на стандартное вещество):

Молоко……..ок. 93%
молочный порошок (с растворением)……ок. 101%
молочный порошок (с экстракцией)……ок. 78%
йогурт, кефир, сливочное масло, сливки……..ок. 104%
творог, сметана……...ок. 92%
масло……ок. 82%
сыр……ок. 74%
мёд……...ок. 106%
маточное молочко……ок. 77 %
мясо (говядина, свинина, птица)……ок. 91%
рыба……...ок. 97%
креветки……ок. 92%
креветки……ок. 98%
яйца……ок. 83%
моча прямое использование (хлорамфеникола глюкуронид) ……..ок. 113%
моча гидролизованная (хлорамфеникол) ……...ок. 101%
плазма/сыворотка……..ок. 96%
корма……...ок. 104%

Специфичность теста RIDASCREEN® Chloramphenicol была установлена посредством определения кросс-реактивности к соответствующим веществам в буферной системе. Специфичность в образцах может отличаться от специфичности, определяемой в буферных системах, за счёт матричного эффекта. Перед тем, как начать тестирование перекрёстно-реагирующих веществ, пользователь должен определить предел обнаружения (Limit of Detection) и полноту извлечения (Recovery) для данных веществ в определённых типах образца. Данный тест не должен использоваться для установления различия между перекрёстно реагирующими веществами.

Специфичность (в буферной системе):	Хлорамфеникол (RR-пара-стереоизомер) (стандартное вещество)…….....100% Декстрамицин (SS-пара-стереоизомер)……< 1% все иные стереоизомеры - не определены Хлорамфеникольная основа……< 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 глюкуронид……..ок. 68 %
Специфичность:	Хлорамфеникол глюкуронид (в бычьей моче) ……..ок. 51% Хлорамфеникол глюкуронид (в свиной моче) ……..ок. 68%

Для повышения качества оценки при выполнении процедур ИФА мы дополнительно ссылаемся на наше Руководство по надлежащей практике ИФА (GEP) в соответствующей версии. В них перечислены минимальные стандарты, касающиеся базовых условий при использовании тест-наборов R-Biopharm AG и проведении ИФА-анализа. Руководство можно найти, распечатать и загрузить с веб-сайта официального дистрибьютора:

ООО «Неотест», РФ	https://neo-test.ru/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	
ОДО «КомПродСервис», РБ	https://komprod.com/wp-content/uploads/2021/10/prakticheskoe-rukovodstvo-ifa-rus.pdf	

1. Применение

Набор RIDASCREEN® Chloramphenicol (R1511) предназначен для количественного определения хлорамфеникола в молоке, молочном порошке, молочной продукции, меде и маточном молочке, рыбе, креветках, мясе, яйцах, моче (так же возможно определение хлорамфеникола глюкуронида), в сыворотке / плазме и в кормах методом конкурентного иммуноферментного анализа.

В сентябре 1998 года в Германии согласно §35 LMBG (01.00 68) был официально лицензирован скрининговый метод для обнаружения остатков хлорамфеникола в молоке. Этим скрининговым методом является иммуноферментный анализ (ELISA).

2. Общая информация

Хлорамфеникол является антибиотиком широкого спектра действия, часто использующимся в животноводстве, благодаря своим отличным антибактериальным и фармакокинетическим свойствам. Однако при воздействии на человека хлорамфеникол может спровоцировать гематотоксические побочные явления, в особенности апластическую анемию. Поскольку дозы хлорамфеникола, способные вызывать эти проявления, до сих пор не определены, использование хлорамфеникола при лечении домашнего скота запрещено. Для тест-систем минимальный требуемый предел был установлен 300 нг/кг.

3. Принцип метода

В основе теста лежит реакция антиген-антитело. Лунки стрипов микротитровального планшета покрыты антителами, связанными с анти-хлорамфеникольными антителами. В лунки вносят стандарты или исследуемые растворы, а также ферментный конъюгат хлорамфеникола. Свободный хлорамфеникол, присутствующий в образце, и хлорамфеникол ферментного конъюгата конкурируют за места связывания антител к хлорамфениколу (конкурентный иммуноферментный анализ). Не связавшийся ферментный конъюгат затем удаляется в процессе промывки.

В лунки вносится раствор субстрат/хромоген. Связавшийся ферментный конъюгат преобразует хромоген в вещество голубого цвета. Добавление стоп-раствора приводит к изменению цвета с голубого на желтый. Оптическая плотность раствора в лунках при 450 нм обратно пропорциональна концентрации хлорамфеникола в образце.

4. Предоставляемые реагенты

Каждый набор содержит достаточное количество материалов для 96 анализов, включая стандартные образцы. Каждый тестовый набор содержит:

Компонент	Цвет крышки	Формат		Объём
Микротитрационный планшет	-	Готов к использованию		96 лунок
Стандарт 1	Белый	Готов к использованию	0 нг/л	1,3 мл
Стандарт 2	Белый	Готов к использованию	25 нг/л	1,3 мл
Стандарт 3	Белый	Готов к использованию	50 нг/л	1,3 мл
Стандарт 4	Белый	Готов к использованию	100 нг/л	1,3 мл
Стандарт 5	Белый	Готов к использованию	250 нг/л	1,3 мл
Стандарт 6	Белый	Готов к использованию	750 нг/л	1,3 мл
Солевой промывочный буфер Твин		Соль для растворения		
Конъюгат	Красный	Готов к использованию		7,5 мл
Субстрат/Хромоген Red Chromogen Pro	Коричневый	Готов к использованию		10 мл
Стоп-реагент	Жёлтый	Готов к использованию		14 мл

5. Необходимые, но не предоставленные материалы

5.1. Оборудование:

Зависит от матрицы

Оборудование	Молоко, моча	Сухое молоко, молочные продукты	Мёд	Маточное молочко	Мясо, рыба, креветки, яйца	Моча после гидролиза	Плазма, сыворотка	Корм
ИФА спектрофотометр (450 нм)	•	•	•	•	•	•	•	•
Градуированные пипетки	•	•	•	•	•	•	•	•
микропипетки вариабельного объёма 20 - 200 мкл и 200 - 1000 мкл	•	•	•	•	•	•	•	•
Миксер		•			•			•
Шейкер		•	•	•	•	•		•
Центрифуга		•	•	•	•	•	•	•

Испаритель		•	•	•	•	•	•	•
Вортекс	•	•	•	•	•	•	•	•
Инкубатор			•	•		•		
Водяная баня		•						

5.2. Реагенты:

Зависит от матрицы

Оборудование	Мёд	Маточное молочко	Мясо, рыба, креветки	Яйца	Моча после гидролиза	Плазма, сыворотка	Корм
Дистиллированная вода	•		•				
Этилацетат ч.д.а.	•	•	•	•		•	•
н-Гексан ≥ 95%			•	•			•
E. coli β-глюкуронидаза					•		
75 мМ калия фосфатный буфер pH 6,8					•		
0,5M NaOH		•					

Оборудование	Йогурт, кефир, сливочное масло, сметана	Сухое молоко, молочные продукты	Творог, прокисшая сметана	Масло	Сыр
20мМ PBS	•				
Реактив Карреза	•	•			
Этилацетат ч.д.а.	•	•	•		•
н-Гексан ≥ 95%		•		•	
20% (об./об.) Метанол				•	
10% (об./об.) Метанол			•	•	•

6. Меры предосторожности для пользователей

Тестирование должно выполняться только хорошо подготовленным и обученным персоналом. Необходимо строго соблюдать требования инструкции.

В состав набора могут входить опасные вещества. Для ознакомления с мерами безопасности при работе с опасными веществами, пожалуйста, изучите соответствующие паспорта безопасности – material safety data sheets (MSDS), доступные в режиме online на сайте www.r-biopharm.com.

7. Инструкции по хранению

Набор должен храниться при 2 – 8°C. Не замораживайте набор и его компоненты.

Неиспользованные микролунки необходимо поместить назад в оригинальную упаковку из фольги, плотно закрыть её и хранить лунки дальше с поставляемым десикантом при 2 - 8°C.

Раствор субстрата/хромогена чувствителен к свету, поэтому следует избегать попадания на него прямого света.

Гарантия качества не сохраняется по окончании срока годности, указанного на этикетке.

Не следует заменять или комбинировать индивидуальные реагенты из наборов разных серий.

8. Признаки непригодности реагентов

- Окрашивание красноватого раствора субстрата/хромогена в голубой цвет ещё до проведения тестирования
- Значение оптической плотности в лунке с нулевым стандартом ниже 0,6 ($A_{450\ нм} < 0,6$)

9. Подготовка образцов

Образцы следует хранить в прохладном месте, защищёнными от попадания света.

9.1. Молоко коровье (сырое, свежее, пастеризованное, обезжиреное, цельное) и молочный порошок, растворённый в соответствии с инструкцией от производителя.

- перемешайте на вортексе необходимое для гомогенизации количество исследуемого образца;
- для анализа необходимо 50 мкл на лунку;

Чтобы достичь лучшей чувствительности для выявления в молочном порошке, можно прибегнуть к описанной в пункте 9.2 альтернативной методике пробоподготовки.

9.2. Молочный порошок (обезжиренное молоко и цельные сливки). Экстракция

- взвесьте в центрифужной пробирке на 50 мл 1 г молочного порошка и добавьте 10 мл дистиллированной воды. Тщательно взболтайте для полного растворения пробы;
- добавьте 1 мл осадителя 1 (Carrez I) (см. п. 5.2) и тщательно перемешайте на вортексе;
- добавьте 1 мл осадителя 2 (Carrez II) (см. п. 5.2) и тщательно перемешайте на вортексе;
- центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / 4 – 12 °C (если нет центрифуги с охлаждением, охладите пробы перед центрифугированием до 8°C);
- перенесите 7,2 мл супернатанта в новую центрифужную пробирку на 50 мл;

- добавьте в пробирку 6 мл этилацетата и экстрагируйте встряхиванием в течение 10 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 4 мл этилацетатного супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
Если после выпаривания остаются жировые следы, продолжайте, как описано ниже*
- Если жировых следов не обнаружено, растворите сухой остаток в 400 мкл промывочного буфера (п. 10.1) и тщательно перемешайте на вортексе;
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

* В случае обнаружения жировых следов после выпаривания:
- добавьте 400 мкл n-гексана и перемешайте на вортексе;
- добавьте 400 мкл промывочного буфера и перемешайте на вортексе;
- центрифугируйте: 10 мин / 3000 g при комнатной температуре (20 - 25 °C);
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.3. Молочная продукция
9.3.1 Йогурт, кефир, сливочное масло, сливки
- взвесьте в центрифужной пробирке 10 г образца;
- добавьте 8 мл 20 мМ ФСБ и хорошо перемешайте;
- добавьте 1 мл осадителя 1 (Carrez I) (см. п. 5.2) и тщательно перемешайте на вортексе;
- добавьте 1 мл осадителя 2 (Carrez II) (см. п. 5.2) и взбалтывайте в вертикальном направлении в течение 10 минут (вверх – вниз);
- отцентрифугируйте: 10 мин / 4000 g / 4 °C;
- перенесите 4 мл супернатанта в чистую пробирку;
- добавьте 8 мл этилацетата и экстрагируйте встряхиванием (вверх – вниз) в течение 10 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 4 мл этил ацетатного супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 500 мкл промывочного буфера (см. п 10.1);
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.3.2. Творог, сметана
- добавьте 15 мл 10 % метанола к 5 г образца и тщательно перемешайте на вортексе в течение 1 мин;
- отцентрифугируйте: 15 мин / 4,000 g / 4 °C;

- проткните пипеткой слой сливок и перенесите 4 мл образца в новую стеклянную пробирку;
- добавьте 8 мл этилацетата и экстрагируйте встряхиванием (вверх – вниз) в течение 10 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 4 мл этилацетатного супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 500 мкл промывочного буфера (см. п 10.1);
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.3.3. Масло
- отберите навеску 1 г сливочного масла в центрифужную пробирку на 10 мл;
- растопите масло на водяной бане при температуре приблизительно 40 °C;
- добавьте 1 мл n-гексана и тщательно перемешивайте в течение 10 секунд на вортексе;
- добавьте 1 мл метанола 20 % и тщательно перемешайте на вортексе в течение 10 секунд;
- встряхивайте пробирку в течение 10 минут (вверх – вниз);
- отцентрифугируйте: 10 мин / 2,000 g / 4 °C;
- перенесите 700 мкл нижнего водного слоя в новую пробирку на 1,5 мл;
- поместите эту пробирку на лёд на 10 минут;
- отцентрифугируйте: 5 мин / 20,000 g / (20 - 25 °C);
- разбавьте аликвоту нижней водной фазы в соотношении 1:4,5 (1+3,5) буфером для промывки (см. 10.1) (например 200 мкл нижней фазы + 700 мкл буфера для промывки);
- для анализа необходимо 50 µл на лунку.

9.3.4. Сыр
- удалите присутствующую благородную плесень;
- полностью гомогенизируйте 10 г сыра в 30 мл 10% метанола;
- инкубируйте на водяной бане при температуре около 40оС в течение 10 минут, тщательно встряхивайте хотя бы три раза по ходу инкубирования;
- отцентрифугируйте: 15 мин / 4,000 g / 4 °C;
- перенесите 3,5 мл нижнего водного слоя в чистую центрифужную пробирку и добавьте 7 мл этилацетата;
- встряхивайте (вверх – вниз) в течение 10 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 3,5 мл супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;

- растворите сухой остаток в 500 мкл промывочного буфера (см. п 10.1);
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.4 Мёд
- в центрифужной пробирке растворите 2 г мёда в 4 мл дистиллированной воды;
- добавьте 4 мл этилацетата и встряхивайте (вверх – вниз) в течение 10 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 1 мл супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 500 мкл промывочного буфера (см. п 10.1);
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.5. Маточное молочко
- в центрифужную пробирку взвесьте 2 г маточного молочка и добавьте 3 мл 0,5 M NaOH;
- встряхивайте, пока матоное молочко полностью не растворится;
- добавьте 8 мл этилацетата и тщательно перемешайте на вортексе 1 мин;
- встряхивайте (вверх – вниз) в течение 10 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 2 мл супернатанта в новую стеклянную пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 500 мкл промывочного буфера (см. п 10.1);
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.6.1 Мясо (говядина, свинина, куриное мясо), рыба, креветки
- гомогенизируйте полностью исследуемый образец;
- к 3 г гомогенизированного образца добавьте 3 мл дистиллированной воды и 6 мл этилацетата;
- для экстракции перемешивайте в течение 10 минут на шейкере;
- отцентрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 - 25°C);
- перенесите 4 мл супернатанта (соответствует 2 г образца) в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 1 мл н-гексана;
- добавьте 500 мкл буфера для промывки и провортексируйте в тнчение 1 мин;
- отцентрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 - 25 °C);
- для тестирования используют 50 мкл нижней водной фазы на одну лунку.

Хлорамфеникол из креветок можно так же экстрагировать вместе с другими метаболитами нитрофурановых антибиотиков (AHD, AMOZ, AOZ и SEM) в ходе одной пробоподготовки. Полученный экстракт далее можно использовать как с набором RIDASCREEN® Chloramphenicol, так и со всеми наборами RIDASCREEN® Nitrofuran ELISA. Таким образом можно значительно сократить затраты времени и труда.

9.6.2. Пробоподготовка образцов для одновременного определения хлорамфеникола и нитрофуранов в креветках
- полностью гомогенизируйте образец (используйте стомакер или миксер);
- приготовьте 10 мМ 2-нитробензальдегида в ДМСО (этот раствор должен быть приготовлен непосредственно перед использованием, т.е. растворите 7,6 мг 2-нитробензальдегида в 5 мл ДМСО);
- смешайте 1 г гомогенизированного образца с 4 мл деминерализованной воды, 0,5 мл 1 М HCl и 100 мкл 10 мМ 2-нитробензальдегида (в ДМСО) при энергичном встряхивании (вортекс);
Дериватизация
- инкубируйте в течение 3 ч при 50 °C или в течение ночи (около 16 ч) при 37 °C;
- добавьте 5 мл 0,1 М K_2HPO_4, 0,4 мл 1 М NaOH и 10 мл этилацетата и энергично встряхивайте (вортекс) в течение 30 с;
- центрифугируйте: 10 мин/4000 g/ при комнатной температуре (20 - 25 °C);
- перенесите 5 мл этилацетатного слоя (верхний слой) в новую пробирку и выпарите при 60 °C;
- растворите остаток в 1 мл н-гексана и как следует перемешайте с 1 мл промывочного буфера;
- центрифугируйте: 10 мин/4000 g/ при комнатной температуре (20 - 25 °C);
- для тестирования используют 50 мкл нижней водной фазы на одну лунку

9.7 Куриные яйца (цельное яйцо, яичный белок, яичный желток)
- гомогенизируйте полностью исследуемый образец;
- к 2 г гомогенизированного образца добавьте 8 мл этилацетата;
- для экстракции перемешивайте в течение 10 минут на шейкере;
- отцентрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25°C);
- перенесите 4 мл супернатанта (соответствует 1 г образца) в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 1 мл н-гексана;
- добавьте 1000 мкл буфера для промывки и провортексируйте в течение 1 мин;
- отцентрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- для тестирования используют 50 мкл нижней водной фазы на одну лунку.

9.8. Моча (бычья, свиная)

Если домашнему скоту был прописан хлорамфеникол и животные его получали, в их печени происходит его метаболизм до формы конъюгата с глюкуроновой кислотой. Конечный продукт – глюкуронид хлорамфеникола далее выделяется через почки с мочой. Для тестирования мочи на хлорамфеникол образцы необходимо предварительно подвергнуть гидролизу. При этом глюкуронид хлорамфеникола подвергается действию фермента – глюкуронидазы, поисходит разрушение этого конъюгата и в результате высвобождённый хлорамфеникол можно анализировать. Поскольку у используемых антител отмечается перекрёстная реакция с хлорамфеникол глюкуронидом в моче, то возможно определять концентрацию хлорамфеникол глюкуронида в моче непосредственно прямым тестированием образца мочи, без пробоподготовки. Для оценки результатов тестирования, пожалуйста, ознакомьтесь с рекомендациями пункта 11. Результаты.

9.8.1 Непосредственное использование при анализе хлорамфеникола глюкуронида в моче

- перемешайте хорошо образец на вортексе;
- если образец мочи мутный, отцентрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 - 25°C);
- для тестирования используют 50 мкл верхней водной фазы на одну лунку;
- если полученные результаты превышают стандартные пределы, образцы мочи следует разбавить промывочным буфером.

9.8.2.Гидролиз для анализа мочи на хлорамфеникол

- в центрифужную пробирку к 0,1 мл мочи добавьте 1 мл 75 мМ фосфатно калиевого буфера с pH 6.8 и 10 мкл β-Глюкуронидазы Escherichia coli и хорошо перемешайте;
- оставьте для гидролиза в течение 3 часов при 37 °C;
- добавьте 2 мл этилацетата и тщательно встряхивайте (вверх – вниз) в течение 10 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 5 мин / 1000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 1000 мкл супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 500 мкл промывочного буфера;
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.9. Плазма, сыворотка (бычья, свиная)

- в реакционную пробирку на 2 мл добавьте 1 мл этилацетата к 500 мкл плазмы / сыворотки;
- перемешайте на вортексе в течение 1 мин;

- для расслоения центрифугируйте: 5 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 700 мкл супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 350 мкл промывочного буфера и перемешайте на вортексе;
- для тестирования используется 50 мкл раствора на лунку.

9.10. Корма
- измельчите полностью образец;
- в центрифужную пробирку добавьте 4 мл этилацетата к 1 г измельчённого образца ;
- перемешайте на вортексе в течение 1 мин;
- для расслоения центрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- перенесите 2 мл супернатанта в новую пробирку и выпаривайте экстракт досуха при 60 °C в слабом потоке азота или воздуха;
- растворите сухой остаток в 1 мл н-гексана;
- добавьте 1000 мкл буфера для промывки и провортексируйте в течение 1 мин;
- отцентрифугируйте: 10 мин / 3000 g / комнатная температура (20 – 25 °C);
- для тестирования используют 50 мкл нижней водной фазы на одну лунку.

10. Проведение теста

10.1. Предварительные указания

Перед началом работы доведите все реагенты до комнатной температуры (20 – 25°C).

Фосфатно-солевой буфер с твином (PBS-Tween), входящий в состав набора, применяется в качестве моющего буфера (см. п.4). Растворите содержимое прилагаемого пакетика буферной соли в одном литре дистиллированной воды. Готовый моющий буфер может храниться при температуре 2 – 8 °C в течение 4 – 6 недель.

Как альтернатива: растворите содержимое пакетика в 100 мл дистиллированной воды для получения 10-кратного концентрата. 10-кратный концентрат может храниться около 8 – 12 недель при комнатной температуре (20 - 25 °C). Для приготовления готового к работе раствора разведите одну часть 10-кратного концентрата в 9 частях дистиллированной воды.

10.2. Ход работы

Воспроизводимость результатов существенно зависит от тщательности промывки лунок. В процессе выполнения анализа не допускайте высыхания микролунок.

1. Вставьте в рамку планшета микролунки в количестве, достаточном для всех стандартов и исследуемых образцов для проведения анализа в двух повторностях. Запишите схему расположения лунок со стандартами и исследуемыми образцами на плашке.

2. Внесите по 50 мкл стандартов или исследуемых образцов в соответствующие лунки для проведения анализа в двух повторностях.

3. Добавьте на дно каждой лунки по 50 мкл конъюгата. Аккуратно перемешайте (вручную) и инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20 – 25 °C).

4. Удалите жидкость из лунок, переверните рамку планшета и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Промойте все лунки 250 мкл моющего буфера (см. п. 10.1). Повторите процедуру промывки лунок еще два раза.

5. Внесите по 100 мкл раствора субстрата / хромогена во все лунки. Перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре (20 – 25 °C) в течение 15 минут в темноте.

6. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора и перемешайте, осторожно вращая планшет рукой. В течение 30 минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность при 450 нм.

11. Результаты

Для обработки результатов анализа компанией R-Biopharm было разработано специальное программное обеспечение для иммуноферментных тестов RIDASCREEN®: программа RIDA®SOFT Win.net, (Кат. № Z9996). Пример стандартной кривой дан в сертификате обеспечения качества на тест-систему.

Программное обеспечение RIDA ® SOFT Win и инструкцию к нему Вы можете бесплатно скачать на сайте официальных дистрибьюторов:

ООО «Неотест», Россия	https://neo-test.ru/programmnoe-obespechenie/	
ОДО «КомПродСервис», Беларусь	https://komprod.com/programmnoe-obespechenie/	

Инструкция по обработке результатов анализа без использования программного обеспечения:

$$\frac{\text{Оптическая плотность стандарта/пробы}}{\text{Оптическая плотность нулевого стандарта}} \times 100 = \%\ \text{оптической плотности}$$

Нулевой стандарт приравнивается, таким образом, к 100%, а величины оптической плотности (ОП) указываются в процентах. По величинам относительной оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации хлорамфеникола в нг/л строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат.

12. Интерпретация результатов

Для того чтобы вычислить концентрацию хлорамфеникола в нг/л / нг/кг (ppt) или в мкг/л / мкг/кг (ppb) в исследуемой исходной пробе, величину концентрации, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разведения. При работе в соответствии с протоколом пробоподготовки, факторы разведения для образцов будут следующе:

молоко – 1;

молочный порошок (с растворением) – инструкция от производителя;

молочный порошок (с экстракцией) – 1;

йогурт, кефир, сливочное масло, сливки - 0,5;

творог, сметана – 1;

масло – 5,2;

сыр – 1;

мёд – 1;

маточное молочко – 1;

мясо, рыба, креветки – 0,25;

одновременное определения хлорамфеникола и нитрофуранов в креветках – 2;

яйца – 1;

моча, прямое использование – 1;

моча после гидролиза – 10;

плазма/сыворотка – 1;

корма – 2.

Анализ образцов мочи

Хлорамфеникола глюкуронид содержится исключительно в образцах мочи. Хлорамфеникола глюкуронид может быть определён при прямом использовании мочи для данного теста. Полученное значение концентрации необходимо подкорректировать из-за перекрёстной реактивности антител на хлорамфеникола глюкуронид в бычьей или свиной моче.

Для расчётов можно применять следующую формулу:

$$\text{концентрация хлорамфеникол глюкуронида} = \frac{\text{концентрация}}{\text{перекрёстная реактивность}}$$

Теоретическую концентрацию хлорамфеникола, соответствующую измеренной концентрации хлорамфеникола глюкуронида может быть рассчитана, если принять во внимание молярное соотношение между хлорамфениколом и глюкуроновой кислотой. Это молярное соотношение составляет 0.65.

Для расчётов можно применять следующую формулу:

Концентрация хлорамфеникола = концентрация хлорамфеникола глюкуронида * 0,65

Благодаря коррекции по перекрёстной реактивности и молярному соотношению, расчёт значения концентрации хлорамфеникола не точен. Чтобы определить точную концентрацию хлорамфеникола в моче, процедура гидролиза образца мочи является обязательной.

Если же принять во внимание фактор разведения образца при пробоподготовке, значение концентрации, полученное после гидролиза, представляет собой концентрацию хлорамфеникола в образце мочи.

Представленные данные соответствуют нашему пониманию данной технологии и обеспечивают информацией о нашей продукции и о том, как её использовать. R-Biopharm AG гарантирует стандартное качество всех материалов, входящих в состав набора. В случае изначального дефекта каких-либо материалов R-Biopharm обеспечивает их замену. R-Biopharm AG не отвечает за любые повреждения, вытекающие из-за некорректной работы с набором, а также не покрывает расходы, связанные напрямую или косвенно с неправильным применением данного набора.

13. Рекомендация

Для обеспечения высокой аналитической эффективности мы рекомендуем:

- Анализировать каждый образец в дубликатах.
- Проводить эксперименты со спайками для контроля за правильностью и точностью процедуры анализа.

ДОПОЛНЕНИЕ К ИНСТРУКЦИИ

Подготовка проб и растворов в соответствии с МВИ.МН 2436-2015

Подготовка проб яиц, яичного порошка

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с и. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Образец яичного порошка перемешивают и восстанавливают в соответствии с п. 5.2.2 ГОСТ 30364.0. Перед отбором навесок восстановленный яичный порошок тщательно перемешивают. Яйца освобождают от скорлупы и гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца яиц или восстановленного яичного порошка отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с точностью до 0.01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см3. В каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 12 см3 этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугирую'!' при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозаторрмпадосадбчиую жидкость (этилацетат) объемом 6 см^3, и переносят ее в пробирки вместимостью 10 см^3. Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 1 см3, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 1 см^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см^3.

Центрифугируют пробы в следующем режиме: от 20 °С до 25 °С, 3000 g, 10 мин.

После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.5.1 Подготовка проб мяса, готовых к употреблению мясных продуктов

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. С готовых к употреблению мясных продуктов удаляют оболочку и поверхностный слой. Образцы гомогенизируют с помощью гомогенизатора или блендера.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 3,00 г, взвешенные с точностью до 0,01г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см^3 и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 3 см3 дистиллированной воды и 6 см^3 этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают па шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 см^3, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3.

Выпаривают этил ацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором н-гексан объемом 1 см^3, перемешивают содержимое пробирок на вортексе в течение 1 мин. Далее в пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 0,5 см^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин, после чего содержимое переливают в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см^3.

Центрифугируют пробы в следующем режиме: от 20 °С до 25 °С, 3000 g, 10 мин.

После центрифугирования из пробирок удаляют дозатором верхний органический слой.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.5.2 Подготовка проб сыра

Доводят температуру образца сыра, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают.

От измельченного образца сыра отбирают две параллельные навески массой 15,0 г, взвешенные с точностью до 0,1 г. Навески помещают в стаканы вместимостью 150 см^3 или в контейнеры, входящие в комплект миксера. К навескам сыра добавляют отмеренные пипеткой 30 см^3 раствора метанола (1:9 по объему), приготовленного по п. 9.3.1. Смесь гомогенизируют с помощью лабораторного миксера, не допуская ее разбрызгивания.

Переносят гомогенизированную смесь в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 см^3 и выдерживают ее на водяной бане при температуре от 40 °С до 45 °С в течение 10 мин. За это время смесь перемешивают три раза, энергично встряхивая пробирку.

Пробирки помещают на лед и. выдерживают в течение 15 мин. После этого проводят центрифугирование при температуре 4 °С, 3000 g, в течение 15 мин.

Переносят дозатором 4,8 см^3 водного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3, добавляют отмеренные дозатором 8 см^3 этилацетата и интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин.

Центрифугируют пробирки при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

Отбирают дозатором 4 см^3 органического слоя (этилацетат) и переносят в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 1 см^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при; температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.5.3 Подготовка проб масла

Образец масла, отобранный в соответствии с п. 9.1, охлажденный до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца масла от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

От образца масла отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г, и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. Выдерживают пробирки на водяной бане при температуре 40 °С ± 5 °С до полного расплавления навески масла.

Сразу же после расплавления масла в пробирки с пробами добавляют 1 см^3 гексана, отмеренного дозатором, и интенсивно перемешивают на вортексе

в течение 20 с. Добавляют в пробирки отмеренный дозатором 1 см^3 раствора метанола (2:8 по объему), приготовленного по п. 9.3.2. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают па вортексе в течение 20 с, после чего продолжают перемешивание на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин.

Центрифугируют пробирки при 4 °С, 2000 g, в течение 10 мин. Осторожно удаляют верхний гексановый слой с помощью пипетки Пастера.

В пробирки с пробами снова добавляют 1 см^3 гексана, отмеренного дозатором, и интенсивно перемешивают на вортексе в течение 20 с. Повторяют центрифугирование при 4°С, 2000 g, в течение 10 мин, после чего осторожно удаляют верхний гексановый слой пипеткой Пастера.

700 мм^3 водного слоя переносят дозатором в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см3. Пробирки помещают на лед и выдерживают в течение 10 мин. После этого проводят центрифугирование при температуре от 20 °С до 25 °С, 20000 g, в течение 5 мин. При отсутствии центрифуги, обеспечивающей вышеуказанный режим, вместо центрифугирования проводят фильтрование через шприц-фильтр.

Отбирают дозатором 200 мм^3 водной фазы и переносят в стеклянную пробирку вместимостью 5 см^3. Затем в пробирку дозатором добавляют 700 ммл буфера для разбавления проб и тщательно перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.5.4 Подготовка проб молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания (метод экстракции)

9.5.6.1 Восстановление сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

В стаканы вместимостью 100 см^3 или 150 см^3 помещают 2 параллельные навески образца сухого молока, взвешенные с точностью до 0,1 г. Массы навесок в зависимости от содержания жира составляют:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;
- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

Затем в стаканы с навесками порциями по 5-10 см^3 приливают дистиллированную воду, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения сухого молока растворы из стаканов количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см^3, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Восстановление проб сухих молочных смесей для //// по приведенной выше схеме, используя отношение массы смеси к объему воды, указанное в инструкции производителя.

9.6.2 Получение подготовленных проб сырого, пастеризованного, стерилизо-ванного и восстановленного сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания

Доводят температуру образца сырого, пастеризованного, стерилизованного молока, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего образец перемешивают путем встряхивания и переворачивания упаковки. Перед отбором аликвоты образец переносят в коническую колбу вместимостью 100 см3 в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

От образца сырого, пастеризованного, стерилизованного молока, подготовленного, как описано выше, или восстановленных согласно п. 9.5.6.1 сухого молока или сухих молочных смесей для детского питания с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 10 см^3 и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. В пробирки добавляют отобранные дозатором 500 мм^3 реактива Карреза 1, приготовленного по п. 9.3.3 и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее в пробирки добавляют отобранные дозатором 500 мм3 реактива Карреза 11, приготовленного по п. 9.3.4, перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4 °С, 3000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая пробы молока до температуры от плюс 2 °С до плюс 4 °С, контролируя температуру термометром.

Дозатором переносят 4,4 см^3 надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 см' этил ацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают па шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 см^3, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 400 мм^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.Получение подготовленных проб сгущенного молока

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

От образца отбирают две параллельные навески массой 5,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. В пробирки добавляют отобранные дозатором 5 см^3 дистиллированной воды и перемешивают до образования однородной смеси.

Затем в пробирки добавляют отобранные дозатором 500 мм^3 реактива Карреза I, приготовленного по и. 9.3.3 и тщательно перемешивают содержимое пробирок. Далее в пробирки добавляют отобранные дозатором 500 мм^3 реактива Карреза II, приготовленного по п. 9.3.4, перемешивают на вортексе в течение 1 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4 °С, 3000 g, 10 мин.

При отсутствии центрифуги с охлаждением пробы перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10-15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 2 °С до плюс 4 °С, контролируя температуру термометром.

Дозатором переносят 4 см^3 надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 и добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 см^3 этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 см^3, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3.

Выпаривают этил ацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 400 мм^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

9.5.5 Подготовка проб творога, творожных продуктов

От образца предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего перемешивают.

От образца отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см^3. В пробирки добавляют отобранные дозатором 16 см^3 20 мМ фосфатного буфера, приготовленного по п. 9.3.6, и 1 см3 реактива Карреза I, приготовленного по п. 9.3.3, и тщательно перемешивают содержимое пробирок.

Далее в пробирки добавляют отобранные дозатором 1 см3 реактива Карреза II, приготовленного по п. 9.3.4, перемешивают при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин и центрифугируют в следующем режиме: 4 °С, 3000 g, 15 мин.

Дозатором переносят 4 см^3 надосадочного слоя в пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см^3 и добавляют отмеренные дозатором или пипеткой 8 см^3 этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 5 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 4 см^3, и переносят се в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 400 мм^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается храпение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФЛ растворы перемешивают.

9.5.6 Подготовка проб меда

Доводят температуру образца, отобранного в соответствии с п. 9.1, от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре, после чего перемешивают.

От образца отбирают две параллельные навески массой 2,00 г, взвешенные с точностью до 0,01 г помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3. В пробирки добавляют отобранные дозатором 4 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают содержимое пробирок до растворения навески меда.

Далее в пробирки добавляют отобранные или пипеткой 4 см^3 этилацетата. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают на шейкере или при переворачивании на ротаторе в течение 10 мин, после чего центрифугируют при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С, 3000 g, в течение 10 мин.

После центрифугирования из каждой пробы отбирают дозатором надосадочную жидкость (этилацетат) объемом 1 см^3, и переносят ее в стеклянные пробирки вместимостью 5 см^3 или 10 см^3.

Выпаривают этилацетат из пробирок в слабом токе азота при температуре до 60 °С до отсутствия запаха этилацетата.

К сухому остатку в пробирках добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом 500 мм^3 и перемешивают на вортексе в течение 1 мин.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных растворов проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25°С в течение одного часа.

Перед отбором аликвот для проведения ИФА растворы перемешивают.

Данные соответствуют нашему нынешнему состоянию технологий и предоставляют информацию о наших продуктах и их использовании. R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлены ее продукты, имеют стандартное качество. Дефектные продукты будут заменены. Нет никаких гарантий товарной пригодности этого продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. Р-Биофарм не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникшие прямо или косвенно от использования этого продукта.