

---

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

---



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
СТАНДАРТ  
РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р  
54655—  
2011

---

# МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ

## Метод определения антибиотиков

Издание официальное



Москва  
Стандартинформ  
2012

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация Российской Федерации. Основные положения»

### Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Государственным научным учреждением Научно-исследовательским институтом пчеловодства Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ НИИ пчеловодства Россельхозакадемии) и Обществом с ограниченной ответственностью «Аналитический центр Апис»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 432 «Пчеловодство»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 804-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом 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, 2012

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

II

**МЕД НАТУРАЛЬНЫЙ****Метод определения антибиотиков**

Natural honey. Method for determination of antibiotics

Дата введения — 2013—01—01

**1 Область применения**

Настоящий стандарт распространяется на натуральный мед и устанавливает метод определения остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы и левомицетина (хлорамфеникола) (далее — ХАФ) на основе твердофазного иммуноферментного анализа (далее — ИФА).

Пределы обнаружения составляют:

- для тетрациклина, ролитетрациклина — 6 мкг/кг,
- левомицетина — 0,025 мкг/кг.

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 12.1.019—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 51568—99 (ИСО 3310-1—90) Сита лабораторные из металлической проволочной сетки. Технические условия

ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

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

ГОСТ 3145—84 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 19792—2001 Мед натуральный. Технические условия

ГОСТ 19881—74 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

**Примечание** — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым 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 и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 19792, ГОСТ Р ИСО 5725-1, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **антибиотики**: Широкий спектр антимикробных ветеринарных препаратов (в т. ч. тетрациклины, левомицетин), используемых для профилактики и лечения инфекционных заболеваний пчел.

3.2 **остаточное количество антибиотика в меде**: Массовая доля остатка антибиотика в меде, выражают в микрограммах на килограмм.

3.3 **иммуноферментный анализ; ИФА** (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA): Лабораторный иммунологический метод качественного определения и количественного измерения антигенов и антител.

### 4 Требования безопасности

4.1 Требования электробезопасности при работе с приборами — по ГОСТ Р 12.1.019.

4.2 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.3 При выполнении анализов необходимо соблюдать требования безопасности при работе с химическими реактивами согласно ГОСТ 12.1.007.

### 5 Отбор и подготовка пробы меда

5.1 Отбор проб — по ГОСТ 19792.

5.2 Закристаллизованный мед размягчают на водяной бане, предназначенной для равномерного обогрева с помощью трубчатых электрических нагревательных элементов мощностью не более 1000 Вт, напряжение сети 220 В, диапазон регулировки температуры от 20 °С до 100 °С или в сушильном шкафу по ГОСТ 14919 при температуре не выше 40 °С и продавливают металлическим или пластмассовым шпателем с длиной рабочей поверхности не менее 20 мм через сито по ГОСТ Р 51568. Крупные механические частицы удаляют вручную.

5.3 Сотовый мед распечатывают, отделяют от сот с помощью металлического сита без нагревания.

### 6 Определение присутствия и массовой доли антибиотиков тетрациклиновой группы

#### 6.1 Сущность метода

Базовым принципом для количественного определения антибиотиков тетрациклиновой группы в меде является твердофазный конкурентный ИФА на планшетах из полистирола. Метод основан на конкуренции свободного антибиотика из меда и антибиотика, предварительно адсорбированного на твердой фазе (лунке планшета) в составе белкового конъюгата, за центры связывания специфичных к

тетрациклином антител во вносимом растворе. После отделения несвязавшихся реагентов количество антител, прореагировавших с иммобилизованным антигеном, определяют с помощью вторичных анти-видовых антител, меченных пероксидазой хрена. Количество связавшегося с антителами конъюгата вторичных антител определяют с помощью субстрат-хромогенной смеси. Количество определяемого антибиотика, содержащегося в анализируемой пробе, обратно пропорционально регистрируемой оптической плотности продукта ферментативной реакции.

## 6.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы и реактивы

6.2.1 Фотометр микропланшетный вертикального сканирования с фильтрами, соответствующими длине волны 450 нм.

6.2.2 Дозаторы пипеточные автоматические с переменным объемом дозирования 0,010—0,100 см<sup>3</sup>; 0,100—1,000 см<sup>3</sup> и 1,000—5,000 см<sup>3</sup> одноканальные.

6.2.3 Дозаторы пипеточные автоматические восьмиканальные с переменным объемом дозирования 0,050—0,300 см<sup>3</sup>.

6.2.4 Наконечники для автоматических пипеток вместимостью от 0,300 до 1,000 и до 5,000 см<sup>3</sup> однократного применения.

6.2.5 Анализатор потенциометрический с пределом допускаемой основной погрешности измерений  $\pm 0,01$  ед. рН по ГОСТ 19881.

6.2.6 Весы по ГОСТ Р 53228, с пределами допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более  $\pm 0,1$  мг и не более  $\pm 0,002$  г.

6.2.7 Шейкер лабораторный для пробирок.

6.2.8 Часы механические с сигнальным устройством по ГОСТ 3145.

6.2.9 Центрифуга настольная с эффективностью не менее 3000 г или иного типа с теми же характеристиками.

6.2.10 Ультразвуковая ванна с эффективной мощностью ультразвука 60 Вт.

6.2.11 Аппарат универсальный для встряхивания.

6.2.12 Стаканы химические вместимостью 50, 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336.

6.2.13 Колбы мерные вместимостью 1000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770.

6.2.14 Цилиндры мерные 2-25-1 по ГОСТ 1770.

6.2.15 Набор реагентов для количественного определения тетрациклина типа «Ридаскрин Тетрациклин».

6.2.16 Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 2-водный, с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

6.2.17 Натрий фосфорнокислый 1-замещенный 1-водный, с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

6.2.18 Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

6.2.19 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

6.2.20 Вода для лабораторного анализа категории 1 по ГОСТ Р 52501.

6.2.21 Твин 20, имп.

6.2.22 Стеклоаналитические вials вместимостью 1,5, 80 см<sup>3</sup> с завинчивающимися крышками.

6.2.23 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

6.2.24 Термостат или другое устройство, позволяющее производить равномерный нагрев до температуры 40 °С.

## 6.3 Характеристика набора для иммуноферментного определения тетрациклинов

Для иммуноферментного определения тетрациклинов применяют промышленно изготовленные наборы, характеристики которых должны быть не ниже указанных в 6.3.1.

### 6.3.1 Состав набора<sup>1)</sup>

6.3.1.1 Планшет микротитровальный на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), сенсбилизированных препаратом тетрациклина, — 1 шт.

6.3.1.2 Комплект стандартных растворов тетрациклина со следующими массовыми концентрациями 0; 1,5; 4,5; 13,5; 40,5; 121,5 нг/см<sup>3</sup> в водном растворе по 1,3 см<sup>3</sup> — 6 флаконов.

6.3.1.3 Раствор антител — 6,0 см<sup>3</sup>.

6.3.1.4 Конъюгат вторичных антител с пероксидазой — 10,0 см<sup>3</sup>.

<sup>1)</sup> Отработка метрологических характеристик метода проводилась с применением наборов «Ридаскрин Тетрациклин». Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не содержит требований применять данный набор.

6.3.1.5 Субстрат/хромоген, содержащий пероксид карбамида (мочевины) и тетраметилбензидин, — 10,0 см<sup>3</sup>.

6.3.1.6 Стоп-реагент, содержащий 1 Н серную кислоту, — 14,0 см<sup>3</sup>.

6.3.1.7 Буфер 1 для разбавления стандартных растворов тетрациклина и растворов образцов — 50,0 см<sup>3</sup>.

6.3.1.8 Смесь солей для приготовления 1 дм<sup>3</sup> моющего буфера.

Примечание — Набор рассчитан на проведение 48 определений в двух повторностях, включая анализируемые пробы и калибровочные растворы (всего 96 определений на один планшет).

### 6.3.2 Аналитические характеристики набора

#### 6.3.2.1 Специфичность метода

Метод анализа при использовании набора характеризуется показателем специфичности, составляющим для:

тетрациклина — 100 %;

ролитетрациклина — 100 %;

хлортетрациклина — 42 %;

демеклоциклина — 27 %;

окситетрациклина — 13 %;

доксидоциклина — 8 %.

#### 6.3.2.2 Чувствительность метода

Пределы обнаружения:

- тетрациклина, ролитетрациклина — 6 мкг/кг;

- хлортетрациклина — 15 мкг/кг;

- демеклоциклина — 23 мкг/кг;

- окситетрациклина — 50 мкг/кг;

- доксициклина — 75 мкг/кг.

Показатель извлекаемости тетрациклина из меда — (107 ± 11) %.

### 6.3.3 Рекомендации по использованию наборов

6.3.3.1 При проведении испытаний следует использовать реагенты и компоненты, входящие в один и тот же набор. Разбавление или замена реагентов, использование реагентов из набора с другим номером партии могут привести к потере чувствительности или ошибке определения.

6.3.3.2 Необходимо хранить наборы при температуре 2 °С—8 °С.

Не допускается хранение при отрицательной температуре и замораживание реагентов набора. Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) их герметично упаковывают в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем.

6.3.3.3 Необходимо избегать попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором хромогена из-за его светочувствительности.

6.3.3.4 Раствор хромогена подкрашен в розовый цвет для удобства использования. В случае окрашивания раствора хромогена в голубой цвет его применение для анализа не допускается, поскольку такое окрашивание раствора хромогена является признаком порчи.

6.3.3.5 Сроки хранения отдельных компонентов набора указаны на упаковке.

### 6.3.4 Требования техники безопасности при проведении определений

6.3.4.1 Стандартные растворы содержат тетрациклин, поэтому требуется особая осторожность.

6.3.4.2 Стоп-реагент содержит серную кислоту, поэтому следует избегать контакта стоп-реагента с кожей.

## 6.4 Проведение испытаний с применением набора

6.4.1 Отбор и подготовка проб меда — по разделу 5.

### 6.4.2 Приготовление раствора натрия гидроксида молярной концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup>

(4,00 ± 0,01) г натрия гидроксида по 6.2.19 взвешивают в стакане вместимостью 100 см<sup>3</sup> по 6.2.12, растворяют в 75 см<sup>3</sup> воды для лабораторного анализа по 6.2.20, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup> по 6.2.13, доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

### 6.4.3 Приготовление фосфатного буфера 1 молярной концентрацией 20 ммоль/дм<sup>3</sup> для разбавления стандартных растворов тетрациклина и растворов образцов

(0,55 ± 0,01) г натрия фосфорнокислого 1-замещенного 1-водного по 6.2.17 взвешивают в стакане вместимостью 50 см<sup>3</sup> по 6.2.12, растворяют в 25 см<sup>3</sup> воды для лабораторного анализа, количественно

переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>. Аналогично взвешивают и растворяют (2,85 ± 0,01) г натрия фосфорнокислого 2-замещенного 2-водного по 6.2.16 и (9,00 ± 0,01) г натрия хлористого по 6.2.18, оба раствора количественно переносят в ту же мерную колбу. В ту же колбу добавляют 800 см<sup>3</sup> воды для лабораторного анализа. Раствор тщательно перемешивают. Измеряют значение pH приготовленного раствора, которое должно составлять 7,4 ед. pH. В случае несоответствия значения pH довести его до требуемой величины добавлением в мерную колбу 0,1 N раствора гидроокиси натрия по 6.4.2. Раствор доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения буферного раствора при температуре 6 °С—10 °С — не более одного года.

#### 6.4.4 Приготовление моющего буферного раствора с твином 20

Фосфатный буферный раствор готовят по 6.4.3. Количественно переносят 500 см<sup>3</sup> в мерную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>. Дополнительно в мерную колбу добавляют 0,5 см<sup>3</sup> твина 20 по 6.2.21, доводят водой до метки и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора при температуре 6 °С—10 °С — не более одного года.

#### 6.4.5 Приготовление анализируемой пробы

Взвешивают (1,00 ± 0,001) г меда, подготовленного по разделу 5, в стеклянной вiale вместимостью 80 см<sup>3</sup>. Добавляют (49,00 ± 0,001) г фосфатного буфера 1 по 6.4.3 и тщательно закручивают крышку виалы. Виалу помещают в ультразвуковую ванну по 6.2.10 на 5 мин. Затем раствор интенсивно перемешивают на шейкере по 6.2.7 в течение 2 мин. Перед анализом встряхивают пробы вверх-вниз.

#### 6.4.6 Приготовление реагентов для анализа

Перед использованием набора довести температуру всех реагентов до комнатной в пределах 20 °С—25 °С, а после использования охладить все оставшиеся реагенты до температуры 2 °С—8 °С в холодильных приборах по ГОСТ 16317.

В процессе выполнения анализа нельзя допускать высыхания лунок планшета. На всех стадиях определения необходимо избегать воздействия прямого солнечного света.

Растворы антител, конъюгата, субстрата/хромогена, стоп-реагента, входящие в состав набора, поставляются в готовом к употреблению виде. Перед употреблением достаточно вскрыть флакон.

#### 6.4.7 Приготовление стандартных растворов

Подготовку стандартных растворов проводят только в одноразовых стеклянных виалах вместимостью 1,5 см<sup>3</sup>.

Для подготовки к использованию стандартных растворов тетрациклина концентраты стандартных растворов, входящих в состав набора, разбавляют буфером 1 (таблица 1). После разбавления необходимо тщательно перемешать готовые растворы.

После каждой серии определений необходимо готовить свежие стандартные растворы.

Построение градуировочной кривой необходимо проводить для каждой серии определений.

Т а б л и ц а 1 — Приготовление стандартных растворов тетрациклина

| Номер концентрата стандарта | Объем концентрата, см <sup>3</sup> | Объем буфера 1, см <sup>3</sup> | Массовая концентрация разбавленного стандарта, мкг/дм <sup>3</sup> |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--|
| 1                           | 0,050                              | 0,450                           | 0  |
| 2                           | 0,050                              | 0,450                           | 0,150  |
| 3                           | 0,050                              | 0,450                           | 0,450  |
| 4                           | 0,050                              | 0,450                           | 1,350  |
| 5                           | 0,050                              | 0,450                           | 4,050  |
| 6                           | 0,050                              | 0,450                           | 12,150   |

#### 6.4.8 Подготовка микротитровального планшета

Перед выполнением анализа из планшета необходимо извлечь необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, герметично закрыть пакет и поместить на хранение при температуре 2 °С—8 °С.

### 6.4.9 Процедура анализа

6.4.9.1 Вставляют в рамку планшета стрипы (лунки) в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений (стандартные растворы и образцы) в двух повторностях. Записывают координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов. Пример формы записи координат лунок представлен на рисунке 1.

|    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| С1 | С1 | П3  | П3  | П11 | П11 | П19 | П19 | П27 | П27 | П35 | П35 |
| С2 | С2 | П4  | П4  | П12 | П12 | П20 | П20 | П28 | П28 | П36 | П36 |
| С3 | С3 | П5  | П5  | П13 | П13 | П21 | П21 | П29 | П29 | П37 | П37 |
| С4 | С4 | П6  | П6  | П14 | П14 | П22 | П22 | П30 | П30 | П38 | П38 |
| С5 | С5 | П7  | П7  | П15 | П15 | П23 | П23 | П31 | П31 | П39 | П39 |
| С6 | С6 | П8  | П8  | П16 | П16 | П24 | П24 | П32 | П32 | П40 | П40 |
| П1 | П1 | П9  | П9  | П17 | П17 | П25 | П25 | П33 | П33 | П41 | П41 |
| П2 | П2 | П10 | П10 | П18 | П18 | П26 | П26 | П34 | П34 | П42 | П42 |

Рисунок 1 — Пример формы записи координат лунок  
(С — стандартные растворы, П — анализируемые пробы)

6.4.9.2 Одноканальным дозатором по 6.2.2 добавляют по 0,050 см<sup>3</sup> стандартных и анализируемых растворов в соответствующие пары лунок.

6.4.9.3 Восьмиканальным дозатором по 6.2.3 добавляют по 0,050 см<sup>3</sup> раствора антител в каждую лунку. Перемешивают растворы в лунках вручную легкими круговыми движениями рамки планшета по поверхности стола. Ставят в темное место на инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре 20 °С—25 °С.

6.4.9.4 Резко переворачивают планшет и выливают жидкость из лунок, выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, энергичным трехкратным постукиванием рамки с лунками по столу, покрытому фильтровальной бумагой по 6.2.23. Каждую лунку заполняют 0,250 см<sup>3</sup> моющего буфера твином 20 по 6.4.4 и снова удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок моющим буфером еще два раза.

6.4.9.5 Восьмиканальным дозатором добавляют в каждую лунку по 0,100 см<sup>3</sup> раствора конъюгата. Тщательно перемешивают растворы в лунках вручную. Ставят в темное место на инкубацию в течение 15 мин при температуре 20 °С—25 °С.

6.4.9.6 Освобождают и промывают лунки по 6.4.9.4.

6.4.9.7 Восьмиканальным дозатором в каждую лунку добавляют по 0,100 см<sup>3</sup> субстрата/хромогена. Тщательно перемешивают растворы в лунках вручную. Ставят в темное место на инкубацию в течение 15 мин при температуре 20 °С—25 °С.

6.4.9.8 Восьмиканальным дозатором в каждую лунку добавляют по 0,100 см<sup>3</sup> стоп-реагента и тщательно перемешивают растворы в лунках вручную. Планшет помещают в микропланшетный фотометр, измеряют оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм. Измерения проводят в течение 30 мин после добавления стоп-реагента.

### 6.5 Обработка результатов анализа

6.5.1 Для обработки результатов измерений на компьютере используют программное обеспечение RIDASOFT Win. В этом случае окончательный результат выражен в микрограммах на килограмм.

#### 6.5.2 Обработка результатов без использования компьютера

Среднеарифметическое значение двух параллельных определений оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными или анализируемыми растворами, делят на среднеарифметическое значение оптической плотности, измеренной в лунках с нулевым стандартом (С1), результат умножают на 100.

Относительное поглощение или процент поглощения вычисляют по формуле

$$\frac{\text{Среднее значение оптической плотности стандарта (или пробы)}}{\text{Среднее значение оптической плотности нулевого стандарта}} \cdot 100. \quad (1)$$



**Примечание** — Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, меньше 0,6, то это может быть признаком порчи реагентов. В этом случае следует заменить реагенты и повторить определение.

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим известным значениям концентрации тетрациклина в микрограммах на килограмм строят градуировочную кривую в полулогарифмической системе координат.

Концентрацию тетрациклина в растворах анализируемых проб в микрограммах на килограмм определяют по градуировочной кривой в соответствии с относительным поглощением, измеренным и вычисленным для каждого раствора.

Для определения массовой доли тетрациклина в анализируемой пробе в микрограммах на килограмм величину концентрации тетрациклина, полученную по градуировочной кривой, умножают на 50 (коэффициент разбавления при выполнении анализа в точном соответствии с приведенной методикой).

Для определения массовой доли окситетрациклина в анализируемой пробе в микрограммах на килограмм с учетом показателя специфичности величину концентрации тетрациклина, полученную по градуировочной кривой, умножают на 400 (коэффициент разбавления при выполнении анализа в точном соответствии с приведенной методикой).

Вычисления проводят с записью результата до второго десятичного знака.

Окончательный результат записывают с точностью до первого десятичного знака.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений  $M_{T,1}$  и  $M_{T,2}$ , если выполняется условие приемлемости

$$|M_{T,1} - M_{T,2}| \leq r, \quad r = 2,8 \cdot \sigma_r \cdot 0,01 \cdot \overline{M}_T, \quad (2)$$

где  $M_{T,1}$  и  $M_{T,2}$  — значения результатов параллельных определений остаточных количеств антибиотиков группы тетрациклина;

$r$  — предел повторяемости для двух результатов параллельных определений при доверительной вероятности  $P = 0,95$  (таблица 3);

$\overline{M}_T$  — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений остаточных количеств антибиотиков группы тетрациклина.

## 6.6 Точность метода

Статистический анализ результатов испытаний по оценке точности метода проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6. Диапазон измерений массовой доли тетрациклина, для которого рассчитаны метрологические характеристики, составляет 7,5—600 мкг/кг.

### 6.6.1 Повторяемость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух измерений  $M_{T,1}$  и  $M_{T,2}$ , которые получены в условиях повторяемости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, одна и та же лаборатория, один и тот же оператор, одно и то же оборудование, короткий промежуток времени), не должно превышать предела повторяемости  $r = 2,8 \cdot \sigma_r \cdot 0,01 \cdot \overline{M}_T$ . Значения  $r$  и  $\sigma_r$  представлены в таблицах 2 и 3.

**Таблица 2** — Значения характеристик погрешности и ее составляющих при доверительной вероятности  $P = 0,95$

| Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) $\sigma_r$ , % | Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) $\sigma_R$ , % | Показатель точности (границы относительной погрешности) $\pm \delta$ , % |
|---|---|--|
| 3,6   | 5,5   | 11,0   |

**Таблица 3** — Значения пределов повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности  $P = 0,95$

| Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) $r_{lim}$ , % | Предел воспроизводимости (значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях) $R_{lim}$ , % |
|--|--|
| 10   | 15   |

### 6.6.2 Воспроизводимость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых измерений  $\bar{M}_{T,1}$  и  $\bar{M}_{T,2}$ , которые получены в условиях воспроизводимости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, разные лаборатории, разные операторы, различное оборудование), не должно превышать предела воспроизводимости

$$|\bar{M}_{T,1} - \bar{M}_{T,2}| \leq R, R = 2,8 \cdot \sigma_R \cdot 0,01 \cdot \bar{M}_T. \quad (3)$$

Значения  $R$  и  $\sigma_R$  представлены в таблицах 2 и 3.

6.6.3 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий с доверительной вероятностью  $P = 0,95$  не должны превышать значений, приведенных в таблицах 2 и 3.

### 6.6.4 Форма представления результата

Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$$(M_{cp} \pm \Delta), \text{ мкг/кг}, P = 0,95, \quad (4)$$

где  $M_{cp}$  — среднееарифметическое значение результатов двух параллельных определений остаточных количеств антибиотиков группы тетрациклина, полученных в условиях повторяемости;

$\pm \Delta$  — границы характеристик абсолютной погрешности результатов измерения массовой доли тетрациклина, мкг/кг;

$\pm \Delta = \pm \delta \cdot M_{cp} / 100$ , значение относительной погрешности  $\pm \delta$  представлено в таблице 2.

## 7 Определение присутствия и массовой доли левомицетина (хлорамфеникола, ХАФ)

### 7.1 Сущность метода

Базовым принципом для количественного определения ХАФ в меде является твердофазный конкурентный ИФА на планшетах из полистирола. Метод основан на конкуренции свободного ХАФ из анализируемой пробы и конъюгата ХАФ за центры связывания специфических к ХАФ антител, адсорбированных на твердой фазе (лунке планшета). Весь несвязанный ферментный конъюгат удаляется на стадии промывки лунок. Субстрат-хромогеновый раствор добавляют в лунки, связанный ферментный конъюгат взаимодействует с хромогеном, образуются продукты голубого цвета. При добавлении стоп-реагента цвет раствора меняется с голубого на желтый. Количество определяемого ХАФ, содержащегося в исследуемом образце, обратно пропорционально регистрируемой оптической плотности продукта ферментативной реакции, которую измеряют с помощью микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм.

### 7.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, материалы и реактивы — по 6.2 с дополнением:

7.2.1 Многоканальный микроиспаритель или роторно-пленочный испаритель.

7.2.2 Стеклообразные вials вместимостью 1,5 см<sup>3</sup> с закрывающимися крышками.

7.2.3 Колбы круглодонные для роторного испарителя вместимостью 10 см<sup>3</sup> или стеклообразные пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup> для многоканального микроиспарителя.

7.2.4 Пробирки центрифужные с крышками вместимостью 15 см<sup>3</sup> однократного применения.

7.2.5 Набор реагентов для количественного определения хлорамфеникола.

7.2.6 Этилацетат, о. с. ч.

### 7.3 Характеристика набора для иммуноферментного определения ХАФ

Для иммуноферментного определения ХАФ применяют промышленно изготовленные наборы, характеристики которых не ниже указанных в 7.3.1.

#### 7.3.1 Состав набора<sup>1)</sup>

7.3.1.1 Планшет микротитровальный на 96 лунок (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированных антителами против хлорамфеникола, — 1 шт.

<sup>1)</sup> Отработка метрологических характеристик метода проводилась с применением наборов «Ридаскрин Хлорамфеникол». Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не содержит требований применять данный набор.

7.3.1.2 Комплект стандартных водных растворов ХАФ со следующими массовыми концентрациями 0 (нулевой стандарт); 0,025; 0,050; 0,100; 0,250; 0,750 нг/см<sup>3</sup> по 1,3 см<sup>3</sup> — 6 флаконов.

7.3.1.3 Конъюгат ХАФ с пероксидазой (концентрат) — 0,7 см<sup>3</sup>.

7.3.1.4 Субстрат/хромогеновый раствор (розового цвета) — 10,0 см<sup>3</sup>.

7.3.1.5 Стоп-реагент, содержащий 1 Н серную кислоту, — 14,0 см<sup>3</sup>.

7.3.1.6 Буфер для разбавления конъюгата и растворения образцов — 100,0 см<sup>3</sup>.

7.3.1.7 Моющий буфер (соли) для приготовления 10 мМ фосфатного буфера (7,4 ед. рН), содержащего 0,05 % твина 20.

**Примечание** — Набор рассчитан на проведение 48 определений в двух повторностях, включая анализируемые пробы и калибровочные растворы (всего 96 определений на один планшет).

### 7.3.2 Аналитические характеристики набора<sup>1)</sup>

7.3.2.1 Чувствительность метода

Предел обнаружения ХАФ в меде — 0,025 мкг/кг.

Предел количественного определения — 0,075 мкг/кг.

Показатель извлекаемости ХАФ из меда — более 80 %.

Перекрестная чувствительность:

- ХАФ — 100 %;

- ХАФ основной — 12 %;

- тиамфеникол — менее 0,1 %.

### 7.3.3 Рекомендации по использованию наборов

7.3.3.1 При проведении определений используют реагенты и компоненты, входящие в один и тот же набор. Разбавление или замена реагентов, использование реагентов из набора с другим номером партии могут привести к потере чувствительности или ошибке определения.

7.3.3.2 Необходимо хранить наборы при температуре 2 °С—8 °С в холодильных приборах по ГОСТ 16317. Не допускаются хранение наборов при отрицательной температуре и замораживание реагентов набора.

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) их герметично упаковывают в оригинальный фольгированный пакет вместе с имеющимся осушителем.

7.3.3.3 Необходимо избегать попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором хромогена из-за его светочувствительности.

7.3.3.4 При появлении голубоватого окрашивания розоватого раствора субстрата/хромогена его не применяют, поскольку это признак порчи раствора.

### 7.3.4 Требования техники безопасности при проведении испытаний

7.3.4.1 Стандартные растворы содержат ХАФ, поэтому требуется особая осторожность.

7.3.4.2 Стоп-реагент содержит в своем составе серную кислоту, поэтому следует избегать контакта стоп-реагента с кожей.

## 7.4 Проведение определений с применением набора

7.4.1 Отбор и подготовка проб меда — по разделу 5.

### 7.4.2 Приготовление концентрированного фосфатного моющего буфера

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> количественно переносят содержимое пакета с буферным составом из набора 7.3.1.7. Для растворения солей используют воду для лабораторного анализа по 6.2.20. Раствор доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения концентрированного буферного раствора при комнатной температуре 20 °С—25 °С — 12 недель или при температуре 6 °С—10 °С — не более одного года.

### 7.4.3 Приготовление рабочего моющего буферного раствора молярной концентрацией 10 ммоль/дм<sup>3</sup>

Перед анализом в цилиндре смешивают концентрированный фосфатный моющий буфер по 7.4.2 и воду для лабораторного анализа в соотношении 1:9.

Срок хранения рабочего моющего буферного раствора при температуре 2 °С—8 °С — не более 6 недель.

<sup>1)</sup> Отработка метрологических характеристик метода проводилась с применением наборов «Ридаскрин Хло-рамфеникол». Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не содержит требований применять данный набор.

#### 7.4.4 Приготовление пробы меда

Взвешивают  $(2,00 \pm 0,002)$  г меда, подготовленного по разделу 5, в центрифужной пробирке вместимостью  $15 \text{ см}^3$  по 7.2.4, добавляют  $4 \text{ см}^3$  воды для лабораторного анализа. Раствор интенсивно перемешивают на шейкере по 6.2.7 до полного растворения меда.

В пробирку добавляют  $4 \text{ см}^3$  этилацетата по 7.2.6, плотно заворачивают крышку и интенсивно встряхивают в течение 10 мин вверх-вниз (или ставят в ультразвуковую ванну).

Пробирку помещают в центрифугу по 6.2.9 для разделения водного и органического слоев. Условия центрифугирования: 10 мин при  $3000 \text{ g}$  и температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ — $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Дозатором по 6.2.2 отбирают  $1 \text{ см}^3$  этилацетатного слоя (что соответствует  $0,5 \text{ г}$  меда) в чистую круглодонную колбу по 7.2.3 (или виалу по 6.2.2). Органический растворитель удаляют с использованием роторного испарителя или высушиванием в токе азота при температуре  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  с использованием микроиспарителя по 7.2.1.

Сухой остаток растворяют в  $0,5 \text{ см}^3$  буфера по 7.3.1.6 (из набора) на шейкере (10 мин) и в ультразвуковой ванне (30 мин).

#### 7.4.5 Приготовление реагентов для анализа

Перед применением набора доводят температуру всех реагентов до комнатной в пределах  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ — $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , а после использования охлаждают все оставшиеся реагенты до  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ — $8 \text{ }^\circ\text{C}$ .

В процессе выполнения анализа нельзя допускать высыхания лунок планшета. На всех стадиях определения следует избегать воздействия прямого солнечного света.

Растворы стандартов ХАФ, субстрата/хромогена, стоп-реагента, входящие в состав набора, поставляются в готовом к употреблению виде. Перед употреблением достаточно вскрыть флакон.

#### 7.4.6 Приготовление раствора конъюгата

Конъюгат ХАФ с ферментом — концентрат. Так как этот раствор ограниченно стабилен, перед анализом разбавляют только требуемое количество.

Флакон с концентратом аккуратно встряхивают, в одноразовую стеклянную виалу вместимостью  $1,5 \text{ см}^3$  дозатором отбирают конъюгат и буфер по 7.3.1.6 (из набора) в соотношении 1:10. Раствор тщательно перемешивают.

На 4 стрипа по 8 лунок достаточно смешать  $0,2 \text{ см}^3$  концентрата и  $2 \text{ см}^3$  буфера по 7.3.1.6.

#### 7.4.7 Подготовка микротитровального планшета

Перед выполнением анализа из планшета необходимо извлечь необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы следует тщательно упаковать в фольгированный пакет вместе с осушителем, герметично закрыть пакет и поместить на хранение при температуре  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ — $8 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 7.4.8 Порядок проведения анализа

7.4.8.1 В рамку планшета вставляют стрипы (лунки) в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений (стандартные растворы и образцы) в двух повторностях. Записывают координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов. Пример формы записи координат лунок представлен на рисунке 2.

|    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| С1 | С1 | П3  | П3  | П11 | П11 | П19 | П19 | П27 | П27 | П35 | П35 |
| С2 | С2 | П4  | П4  | П12 | П12 | П20 | П20 | П28 | П28 | П36 | П36 |
| С3 | С3 | П5  | П5  | П13 | П13 | П21 | П21 | П29 | П29 | П37 | П37 |
| С4 | С4 | П6  | П6  | П14 | П14 | П22 | П22 | П30 | П30 | П37 | П38 |
| С5 | С5 | П7  | П7  | П15 | П15 | П23 | П23 | П31 | П31 | П39 | П39 |
| С6 | С6 | П8  | П8  | П16 | П16 | П24 | П24 | П32 | П32 | П40 | П40 |
| П1 | П1 | П9  | П9  | П17 | П17 | П25 | П25 | П33 | П33 | П41 | П41 |
| П2 | П2 | П10 | П10 | П18 | П18 | П26 | П26 | П34 | П34 | П42 | П42 |

Рисунок 2 — Пример формы записи координат лунок  
(С — стандартные растворы, П — анализируемые пробы)

7.4.8.2 Одноканальным дозатором по 6.2.2 добавляют по  $0,050 \text{ см}^3$  стандартных и анализируемых растворов в соответствующие пары лунок.

7.4.8.3 Восьмиканальным дозатором по 6.2.3 на дно каждой лунки добавляют по 0,050 см<sup>3</sup> разбавленного раствора конъюгата по 7.4.6. Осторожно перемешивают раствор в лунках вручную легкими круговыми движениями рамки планшета по поверхности стола. Ставят в темное место на инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре 20 °С—25 °С.

7.4.8.4 Резко переворачивают планшет и выливают жидкость из лунок, выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного трехкратного постукивания рамки с лунками по столу, покрытому фильтровальной бумагой по 6.2.23. Каждую лунку заполняют 0,250 см<sup>3</sup> рабочего раствора моющего буфера по 7.4.3 и вновь удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок моющим буфером еще два раза.

7.4.8.5 Восьмиканальным дозатором добавляют в каждую лунку по 0,100 см<sup>3</sup> раствора субстрата/хромогена. Тщательно перемешивают растворы в лунках вручную. Ставят в темное место на инкубацию в течение 15 мин при температуре 20 °С—25 °С.

7.4.8.6 Восьмиканальным дозатором в каждую лунку добавляют по 0,100 см<sup>3</sup> стоп-реактанта и тщательно перемешивают растворы в лунках вручную. Планшет помещают в микропланшетный фотометр, измеряют оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм. Измерения проводят в течение 30 мин после добавления стоп-реактанта.

**Примечание** — При расчете массовой доли левомецитина в анализируемых пробах учитывают фоновый сигнал с помощью постановки холостого опыта. Для этого в каждой серии анализов ставят контрольную пробу без меда, то есть испаряют чистый этилацетат и затем следуют описанной стандартной процедуре. Измененный фоновый сигнал вычитают на стадии обработки результатов.

## 7.5 Обработка результатов анализа

Построение градуировочной кривой проводят для каждой серии определений.

7.5.1 Для обработки результатов измерений на компьютере используют программное обеспечение RIDASOFT Win. Окончательный результат выражают в нанограммах на килограмм.

### 7.5.2 Обработка результатов без использования компьютера

Среднее из двух параллельных значений оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными или анализируемыми растворами, делят на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с нулевым стандартом (С1), результат умножают на 100.

Относительное поглощение или процент поглощения вычисляют по формуле

$$\frac{\text{Среднее значение оптической плотности стандарта (или пробы)}}{\text{Среднее значение оптической плотности нулевого стандарта}} \cdot 100. \quad (5)$$

**Примечание** — Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, меньше 0,6, то это может быть признаком порчи реагентов. В этом случае заменяют реагенты и повторяют определение.

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим известным значениям концентрации ХАФ в нанограммах на килограмм строят градуировочную кривую в полулогарифмической системе координат.

Массовую долю ХАФ в анализируемой пробе меда в нанограммах на килограмм определяют по градуировочной кривой в соответствии с относительным поглощением, измеренным и вычисленным для каждого раствора.

Для определения массовой доли ХАФ в анализируемой пробе меда в микрограммах на килограмм величину концентрации ХАФ, полученную по градуировочной кривой, умножают на 1 (коэффициент разбавления при выполнении анализа в точном соответствии с приведенной методикой) и делят на тысячу (для перевода в микрограммы на килограмм).

Вычисления проводят с записью результата до второго десятичного знака.

Окончательный результат записывают с точностью до первого десятичного знака.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$|M_{\text{ХАФ}, 1} - M_{\text{ХАФ}, 2}| \leq r, r = 2,8 \cdot \sigma_r \cdot 0,01 \cdot \bar{M}_{\text{ХАФ}}, \quad (6)$$

где  $M_{\text{ХАФ}, 1}$  и  $M_{\text{ХАФ}, 2}$  — значения результатов параллельных определений остаточных количеств хлорамфеникола;

$r$  — предел повторяемости для двух результатов параллельных определений при доверительной вероятности  $P = 0,95$  (таблица 5);

$\sigma_r$  — показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) при доверительной вероятности  $P = 0,95$ ;

$\bar{M}_{\text{ХАФ}}$  — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений остаточных количеств хлорамфеникола.

### 7.6 Точность метода

Статистический анализ результатов испытаний по оценке точности метода проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6. Диапазон измерений массовой доли левомицетина (хлорамфеникола), для которого рассчитаны метрологические характеристики, составляет 0,075—0,750 мкг/кг.

#### 7.6.1 Повторяемость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух определений  $M_{\text{ХАФ}, 1}$  и  $M_{\text{ХАФ}, 2}$ , которые получены в условиях повторяемости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, одна и та же лаборатория, один и тот же оператор, одно и то же оборудование, короткий промежуток времени), не должно превышать предела повторяемости  $r = 2,8 \cdot \sigma_r \cdot 0,01 \cdot \bar{M}_{\text{ХАФ}}$ . Значения  $r$  и  $\sigma_r$  представлены в таблицах 4 и 5.

Т а б л и ц а 4 — Значения характеристик погрешности и ее составляющих при доверительной вероятности  $P = 0,95$

| Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) $\sigma_r$ , % | Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) $\sigma_R$ , % | Показатель точности (границы относительной погрешности) $\pm \delta$ , % |
|---|---|--|
| 5,4   | 11  | 22,0   |

Т а б л и ц а 5 — Значения пределов повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности  $P = 0,95$

| Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) $r$ , % отн. | Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях) $R$ , % отн. |
|---|--|
| 15  | 30   |

#### 7.6.2 Воспроизводимость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых измерений  $\bar{M}_{\text{ХАФ}, 1}$  и  $\bar{M}_{\text{ХАФ}, 2}$ , которые получены в условиях воспроизводимости (одна и та же методика, идентичный объект испытания, разные лаборатории, разные операторы, различное оборудование), не должно превышать предела воспроизводимости

$$|\bar{M}_{\text{ХАФ}, 1} - \bar{M}_{\text{ХАФ}, 2}| \leq R, R = 2,8 \cdot \sigma_R \cdot 0,01 \cdot \bar{M}_{\text{ХАФ}}, \quad (7)$$

где  $\sigma_R$  — показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) при доверительной вероятности  $P = 0,95$ ;

$\bar{M}_{\text{ХАФ}}$  — среднеарифметическое значение результатов определений остаточных количеств хлорамфеникола, полученных в условиях воспроизводимости.

Значения  $R$  и  $\sigma_R$  представлены в таблицах 4 и 5.

7.6.3 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий с доверительной вероятностью  $P = 0,95$  не должны превышать значений, приведенных в таблицах 4 и 5.

#### 7.6.4 Форма представления результата

Результат измерения в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$(M_{\text{ср}} \pm \Delta), \text{ мкг/кг}, P = 0,95, \quad (8)$$

где  $M_{\text{ср}}$  — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений остаточных количеств ХАФ, полученных в условиях повторяемости;

$\pm \Delta$  — границы характеристик абсолютной погрешности результатов определения массовой доли ХАФ, мкг/кг;

$\pm \Delta = \pm \delta \cdot M_{\text{ср}}/100$ , значение относительной погрешности  $\pm \delta$  представлено в таблице 4.

Ключевые слова: натуральный мед, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), антибиотики тетрациклиновой группы, левомицетин (хлорамфеникол), точность метода

Редактор *М.Е. Никулина*  
Технический редактор *В.Н. Прусакова*  
Корректор *Р.А. Ментова*  
Компьютерная верстка *В.И. Гриценко*

Сдано в набор 03.09.2012. Подписано в печать 27.09.2012. Формат 60x84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Гарнитура Ариал. Усл. печ. л. 1,86.  
Уч.-изд. л. 1,55. Тираж 221 экз. Зак. 647.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

[www.gostinfo.ru](http://www.gostinfo.ru) [info@gostinfo.ru](mailto:info@gostinfo.ru)

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.

Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.