ГОСТ 11285—93

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЖЕЛЕЗЫ ПОДЖЕЛУДОЧНЫЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ ЗАМОРОЖЕННЫЕ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Издание официальное

БЗ 1—95

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ
ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Госстандартом России

ВНЕСЕН Техническим секретариатом Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации

2 ПРИНЯТ Межгосударственным Советом по стандартизации, метрологии и сертификации 21 октября 1993 г.

За принятие проголосовали:

Наименование государства	Наименование национального органа стандартизации
Республика Беларусь	Белстандарт
Кыргызская Республика	Кыргызстандарт
Республика Молдова	Госдепартамент Молдовастандарт
Российская Федерация	Госстандарт России
Республика Таджикистан	Таджикгосстандарт
Туркменистан	Туркменглавгосинспекция
Украина	Госстандарт Украины

3 Постановлением Комитета Российской Федерации по стандартизации, метрологии и сертификации от 02.06.94 № 160 межгосударственный стандарт ГОСТ 11285—93 введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта Российской Федерации с 01.01.95

4 ВЗАМЕН ГОСТ 11285—73

© ИПК Издательство стандартов, 1995

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен на территории Российской Федерации в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

УДК 615.361.37.002.3:006.354 Группа Н15

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЖЕЛЕЗЫ ПОДЖЕЛУДОЧНЫЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ ЗАМОРОЖЕННЫЕ

Технические условия

Frozen pancreases of cattle and pigs. Specifications

ГОСТ 11285—93

ОКП 92 1831 0340, 92 1833 1340

Дата введения 01.01.95

Настоящий стандарт распространяется на замороженные поджелудочные железы крупного рогатого скота и свиней, признанные ветеринарным контролем годными для производства инсулина.

Требования настоящего стандарта являются обязательными.

1. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ

Поджелудочные железы должны быть собраны раздельно от каждого вида скота и обработаны по технологической инструкции с соблюдением санитарных правил для предприятий мясной промышленности и соответствовать требованиям настоящего стандарта.

1.1. Характеристики

1.1.1. В зависимости от вида скота поджелудочные железы подразделяют на:

поджелудочные железы крупного рогатого скота;

поджелудочные железы свиней.

В зависимости от качества поджелудочные железы подразделяют на два сорта: первый и второй.

Не допускается смешение поджелудочных желез разных видов скота.

1.1.2. По органолептическим и физико-химическим показателям поджелудочные железы должны соответствовать требованиям, указанным в табл. 1.

Издание официальное

Таблица 1

Наименование показателя	Характеристика и норма для поджелудочной железы			
	крупного рогатого скота		свиней	
	I сорта	II сорта	I сорта	II сорта
Внешний вид	Железы должны быть очищены от наружного жира и прирезей соединительной ткани, иметь цельную поверхность без повреждений и заморожены поштучно или в виде пластин или блоков толщиной не более 5 см			
Цвет	От розового с желтоватым оттенком до розовато-красного		От бледно-желтого до розового с белыми нитевидными включениями	
Температура внутри блока или отдельной железы при приемке, °С, не выше	Минус 18			
Массовая доля жира, %, не более	5	7	8	12
Массовая доля инсулина, Ед/кг, не менее	5000	4000	5000	4000

1.2. Маркировка

1.2.1. В каждый ящик вкладывают ярлык с указанием:

наименования предприятия-изготовителя, его подчиненности и (или) его товарного знака;

наименования железы (с указанием вида скота) и ее сорта;

даты сбора железы;

массы нетто и брутто, кг;

срока и условий хранения;

номера упаковщика;

обозначения настоящего стандарта.

1.2.2. Транспортная маркировка — по ГОСТ 14192 с нанесением манипуляционного знака «Ограничение температуры».

Маркировку, характеризующую продукцию, наносят на каждую единицу тары несмывающейся непахнущей краской при помощи штампа, трафарета или наклеивания ярлыка с указанием дополнительных данных:

наименования предприятия-изготовителя, его подчиненности и (или) его товарного знака;

наименования железы (с указанием вида скота) и ее сорта;

даты сбора железы;

массы нетто и брутто, кг;

срока и условий хранения;
обозначения настоящего стандарта.

1.3. Упаковка

1.3.1. Замороженные поджелудочные железы одного вида скота и сорта упаковывают в дощатые ящики по ГОСТ 13361 или в ящики из гофрированного картона по ГОСТ 13513.

1.3.2. Ящики должны быть чистыми, сухими, выстланы внутри полиэтиленовой пленкой по ГОСТ 10354. Допускаются другие полимерные пленки, разрешенные к применению органами здравоохранения. В заполненных ящиках выступающие края пленки должны полностью закрывать сверху поджелудочные железы. Укладывание поджелудочных желез в ящики должно быть плотным, не допускающим их перемещения при встряхивании.

2. ПРИЕМКА

2.1. Поджелудочные железы принимают партиями. Под партией понимают любое количество замороженных поджелудочных желез одного вида скота и сорта, предназначенное к одновременной сдаче-приемке и оформленное одним документом о качестве установленной формы.

2.2. Соответствие упаковки, маркировки требованиям настоящего стандарта и отсутствие следов подмокания и подтеков проверяют на каждом ящике.

2.3. Для проверки соответствия качества поджелудочных желез требованиям настоящего стандарта из разных мест партии отбирают выборку в объеме 5% упаковочных единиц, но не менее 5 ящиков.

2.4. При получении неудовлетворительных результатов испытаний хотя бы по одному показателю по нему проводят повторные испытания удвоенного количества выборок, взятых от той же партии. Результаты повторных испытаний распространяют на всю партию.

2.5. При повышенной массовой доле жира в поджелудочных железах второго сорта они могут быть приняты по согласованию с потребителем.

2.6. Массовую долю инсулина определяют по требованию потребителя.

3. МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

3.1. Отбор и подготовка проб

Для проведения испытаний при замораживании поджелудочных желез поштучно берут не менее чем по 5 желез из каждого

ящика, а при замораживании поджелудочных желез в блоках из разных слоев каждого ящика, отобранного в выборку, отбирают точечные пробы массой 180—200 г. Из точечных проб составляют объединенную пробу массой (1000±20) г, измельчают на мясорубке и тщательно перемешивают, не допуская поднятия температуры в измельченной пробе выше 4°С.

3.2. Определение внешнего вида и цвета

Внешний вид и цвет замороженных поджелудочных желез определяют визуально при дневном свете.

Целостность желез и наличие на них прирезей жировой и соединительной тканей определяют после частичного оттаивания взятых на анализ желез путем визуального осмотра.

3.3. Определение температуры

3.3.1. *Аппаратура*

Термометр стеклянный жидкостной (не ртутный), вмонтированный в металлическую оправу, с диапазоном измерения от минус 38 до 0°С с допускаемой погрешностью измерения ±1°С.

3.3.2. *Проведение испытания*

В замороженной поштучно или в виде блоков (пластин) поджелудочной железе делают отверстие и термометром измеряют температуру на глубине (2,0±0,5) см. Отверстие можно сделать коловоротом вручную. Сверло коловорота должно быть предварительно охлаждено до температуры не выше минус 18°С.

3.4. Определение массовой доли жира с использованием экстракционного аппарата Сокслета

3.4.1. *Аппаратура, материалы, реактивы*

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Шкаф сушильный, обеспечивающий заданный температурный режим (105±0,5)°С.

Эксикатор 2—290 по ГОСТ 25336.

Аппарат Сокслета с экстракционной колбой вместимостью 150 см³.

Стаканчики для взвешивания СВ-24/10 по ГОСТ 25336.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Песок очищенный.

Вата обезжиренная.

Эфир петролейный по ТУ 6—02—1244 с температурой кипения 40—60°С или эфир этиловый по ТУ 7506804—97, х.ч.

3.4.2. *Проведение испытания*

5 г измельченной поджелудочной железы взвешивают с точностью до 0,01 г в предварительно доведенном до постоянной

массы стаканчике с (5,5±0,5) г очищенного песка. Навеску железы тщательно перемешивают с песком и высушивают в сушильном шкафу при температуре (100±0,5)°С в течение 2 ч. Высушенную навеску количественно переносят в бумажную гильзу, на дно которой кладут кусочек обезжиренной ваты. Стаканчик после переноса высушенной навески протирают ватой, смоченной эфиром, и помещают ее в гильзу. Гильзу тщательно закрывают, высушивают в сушильном шкафу при температуре (105±0,5)°С до постоянной массы и помещают в экстрактор аппарата Сокслета. Экстракцию ведут 6 ч при 6—10 сливах экстракта в 1 ч. Полноту обезжиривания проверяют, нанося на фильтровальную бумагу каплю растворителя, стекающего из экстрактора. Процесс считают законченным при отсутствии жирного пятна на бумаге после испарения растворителя. По окончании экстракции гильзу высушивают сначала под тягой, потом в сушильном шкафу при температуре (105±0,5)°С до постоянной массы.

3.4.3. *Обработка результатов*

3.4.3.1. Массовую долю жира (X) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m_2},$$

где m — масса гильзы с навеской до экстрагирования, г;

m_1 — масса гильзы с навеской после экстрагирования, г;

m_2 — масса навески поджелудочной железы, г.

3.4.3.2. За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, рассчитанное до второго и округленное до первого десятичного знака.

3.4.3.3. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при $P=0,95$ не должно превышать 14% по отношению к среднему арифметическому значению.

3.4.3.4. Допускаемое расхождение между результатами испытаний, проведенных в двух разных лабораториях, при $P=0,95$ не должно превышать 18% по отношению к среднему арифметическому значению.

3.5. Определение массовой доли жира с использованием жиромера

3.5.1. *Аппаратура, материалы, реактивы*

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Центрифуга ЦЛМП-24.

Термометр стеклянный жидкостной (не ртутный) с диапазоном измерения температуры 0—100°С с допускаемой погрешностью измерения ±1°С.

Баня для подогрева жиромеров по ТУ 46—22—761.

Жиромеры по ГОСТ 23094.

Штатив химический.

Пробирки П4—10—14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Бюретка 1—2—25—0,1.

Спирт изоамиловый по ГОСТ 5830, ч.д.а., плотностью 0,8108 г/см³.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х.ч., плотностью 1,835 г/см³, раствор 600 г/дм³.

3.5.2. *Проведение испытания*

Навеску измельченной поджелудочной железы массой (5±±0,1) г помещают в пробирку, приливают 5 см³ 600 г/дм³ раствора серной кислоты и гидролизуют на водяной бане при температуре (78±2)°С, периодически тщательно встряхивая содержимое пробирки до получения однообразной бурой массы.

Содержимое пробирки количественно переносят в жиромер, многократно обмывая ее стенки 600 г/дм³ раствором серной кислоты. Пробы переносят при температуре (78±2)°С.

В молочный жиромер переносят гидролизат поджелудочной железы крупного рогатого скота, в сливочный жиромер — гидролизат поджелудочной железы свиней.

В жиромер из бюретки приливают 4 см³ изоамилового спирта, доводят объем жиромера до плечиков, приливая из бюретки 600 г/дм³ раствор серной кислоты. Смесь перемешивают, переворачивая жиромер 7—10 раз, затем пробкой вниз помещают на 10 мин в предварительно нагретую до (78±2)°С водяную баню, после чего жиромеры переносят в центрифугу, располагая их узким концом к центру, и центрифугируют при скорости 1500 об/мин в течение 10 мин. После чего жиромеры вновь помещают на 10 мин в водяную баню и затем снимают показатель жиромера.

При отсутствии четкой границы раздела между жиром и растворителем взбалтывание, нагревание и центрифугирование повторяют.

3.5.3. *Обработка результатов*

3.5.3.1. Массовую долю жира (X_1) в процентах вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{(h \cdot m) \cdot 100}{m_1},$$

где h — высота столбика жира по шкале жиромера, деления;

m — масса жира, соответствующая одному делению жиромера (0,011564 г — одно деление молочного жиромера; 0,052343 г — одно деление сливочного жиромера), г;

m_1 — масса навески поджелудочной железы, г.

3.5.3.2. За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, рассчитанное до второго и округленное до первого десятичного знака.

3.5.3.3. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при $P=0,95$ не должно превышать 15% по отношению к среднему арифметическому значению.

3.5.3.4. Допускаемое расхождение между результатами испытаний, проведенных в двух разных лабораториях, не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому значению при $P=0,95$.

3.6. Определение массовой доли инсулина методом ионообменной хроматографии на колонках

3.6.1. *Аппаратура, материалы, реактивы*

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 общего назначения 3-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025 или электромясорубка бытовая по ГОСТ 20469 с отверстиями решетки диаметром от 3 до 4 мм.

Колориметр фотоэлектрический лабораторный по нормативно-технической документации с устройством для отсчитывания значения оптической плотности и светофильтром с $\lambda_{max}=(600\pm10)$ нм или спектрофотометр для измерения в видимой области спектра.

Потенциометр с погрешностью измерения не более ±0,05 pH.

Центрифуга ЦЛР-1.

Термометр стеклянный жидкостной с диапазоном измерения от 0 до 100°С с допускаемой погрешностью измерения ±1°С.

Мешалка.

Тарелки мелкие столовые диаметром 20 см.

Кювета эмалированная для окрашивания хроматограмм.

Пробирки П4—10—14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Воронка В-56—80 ГХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры 1—25, 1—50, 1—100 по ГОСТ 1770.

Колонки стеклянные диаметром (30±5) мм, высотой (400±±50) мм.

Пипетки 4—2—1; 4—2—2; 4—2—5; 8—2—0,1.

Марля медицинская по ГОСТ 9412.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Бумага хроматографическая быстрая (ленинградская или импортная) марки Б или С.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х.ч., растворы 1 и 0,01 моль/дм³ и 200 г/дм³.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х.ч., плотностью 1,19 г/см³, растворы 1; 0,5 и 0,1 моль/дм³, 180 г/дм³.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х.ч., плотностью 1,835 г/см³.

Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х. ч., растворы 20 и 800 г/дм³.

Медь (II) серно-кислая 5-водная по ГОСТ 4165, ч.д.а., раствор 125 г/дм³.

Индикатор бромфеноловый синий водорастворимый по ТУ 6—09—3719, ч.д.а.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, растворы 650, 700 и 800 г/дм³.

Инсулин кристаллический с активностью (25±1) Ед/мг.

Аммоний уксуснокислый по ГОСТ 3117, ч.д.а., раствор 0,2 моль/дм³.

Аммоний хлористый по ГОСТ 3773, х. ч., раствор 0,2 моль/дм³.

Аммиак по ГОСТ 3760, ч. д. а., плотностью 0,91 г/см³, раствор 125 г/дм³.

Кислота трихлоруксусная кристаллическая по ТУ 6—09—1926, ч., раствор 100 г/дм³.

Бутанол-1 по ГОСТ 6006, ч.д.а., плотностью 0,8092 г/см³.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Катионит КУ 23 И по ТУ 6—05—211—971.

Допускается использование аппаратуры с техническими и метрологическими характеристиками не хуже, а также реактивы по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

3.6.2. *Подготовка к испытанию*

3.6.2.1. *Приготовление системы растворителей*

Бутанол-1, 800 г/дм³, раствор уксусной кислоты и дистиллированную воду смешивают в соотношении 3 : 1 : 5.

3.6.2.2. *Приготовление стандартного раствора инсулина*

Навеску инсулина (9,6±0,1) мг с активностью (25±1) Ед/мин растворяют в 6 см³ раствора соляной кислоты концентрации 0,1 моль/дм³. Полученный раствор содержит 40 Ед инсулина в 1 см³.

3.6.2.3. *Приготовление красителя бромфенолового синего*

Навеску 0,5 г индикатора бромфенолового синего водорастворимого растворяют в 40 см³ дистиллированной воды, разводят в 920 см³ раствора уксусной кислоты концентрации 20 г/дм³, затем добавляют 40 см³ раствора серно-кислой меди концентрации 125 г/дм³.

3.6.2.4. *Приготовление 0,2 моль/дм³ раствора аммония уксуснокислого pH (5,25±0,05)*

Навеску 15,4 г аммония уксуснокислого растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 1 дм³, pH корректируют ледяной уксусной кислотой.

3.6.2.5. *Приготовление 0,2 моль/дм³ раствора аммония хлористого pH (9,5±0,2)*

Навеску 10,7 г аммония хлористого растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 дм³. pH раствора регулируют раствором соляной кислоты концентрации 180 г/дм³ или раствором аммиака концентрации 125 г/дм³.

3.6.2.6. *Подготовка катионита КУ 23 И*

Предварительно просеянный катионит КУ 23 И диаметром зерен не менее 0,3 мм во влажном состоянии вносят в колонки, предварительно заполненные дистиллированной водой. Через слой катионита (на 60 г суховоздушной смолы) пропускают 2 дм³ раствора гидроокиси натрия концентрации 1 моль/дм³, 1 дм³ дистиллированной воды, 2 дм³ раствора соляной кислоты концентрации 1 моль/дм³, 100 см³ раствора этилового спирта концентрации 700 г/дм³. Если катионит не был в употреблении, то описанную операцию повторяют дважды. Скорость пропускания растворов 10 см³/мин.

3.6.3. *Проведение испытания*

К навеске измельченной поджелудочной железы массой 500 г добавляют 1,75 дм³ раствора этилового спирта концентрации 800 г/дм³, подкисленного 2,25 см³ концентрированной серной кислоты, и перемешивают в течение 7 мин мешалкой при температуре (15±1)°С со скоростью (13±1) об/мин, затем приливают 16 см³ раствора соляной кислоты концентрации 0,5 моль/дм³ и продолжают перемешивание в течение 2 ч. После чего отделяют экстракт от жмыха при помощи воронки через двойной слой марли. Жмых заливают 0,75 дм³ раствора этилового спирта концентрации 650 г/дм³ и перемешивают в течение 40 мин. Отделяют экстракт от жмыха через двойной слой марли. Первый и второй экстракты объединяют, добавляют 200 г/дм³ раствор гидроокиси натрия, устанавливая pH (4,5±0,1) (потенциометрически).

Образовавшийся осадок через 5 мин отделяют фильтрацией через складчатый бумажный фильтр. Полученный фильтрат после

установления в нем pH (3,5±0,1) (потенциометрически) 180 г/дм³ раствором соляной кислоты направляют на сорбцию.

Сорбцию инсулина осуществляют на предварительно подготовленном катионите КУ 23 И, помещенном в количестве (60±5) г в стеклянную колонку диаметром (30±5) мм и высотой (400±±50) мм, путем подачи экстракта сверху со скоростью (10±±2) см³/мин. По окончании сорбции пропускают 700 г/дм³ раствор этилового спирта со скоростью (10±2) см³/мин до полного удаления следов жира.

Окончание обезжиривания определяют в пробирке по исчезновению мутного жирового кольца при наслаивании 1—2 см³ исходящего из колонки спиртового раствора на 5—6 см³ воды.

Затем удаляют балластные белки путем пропускания 0,2 моль/дм³ раствора аммония уксуснокислого с pH (5,25±0,05) со скоростью (10±2) см³/мин. Расход раствора аммония уксуснокислого составляет 3 дм³ на 60 г катионита. Полноту удаления балластных веществ контролируют спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Оптическая плотность не должна превышать 0,05.

Десорбцию инсулина осуществляют путем пропускания через колонку 0,2 моль/дм³ раствора аммония хлористого с pH (9,5±±0,2) со скоростью (2±1) см³/мин. Начало сбора элюата определяют по появлению помутнения при добавлении 0,3 см³ элюата к 0,3 см³ раствора трихлоруксусной кислоты концентрации 100 г/дм³. Конец элюирования определяют по слабоположительной реакции с 100 г/дм³ раствором трихлоруксусной кислоты или спектрофотометрически до оптической плотности не меньше 0,05.

Объем элюата измеряют в кубических сантиметрах, определяют его активность методом круговой бумажной хроматографии.

Примечание Перед нанесением на хроматограмму элюат свиной поджелудочной железы разбавляют дистиллированной водой, подкисленной 1 моль/дм³ раствором соляной кислоты до pH (2,5±0,1), в соотношении 1 : 1. Соответственно в формуле расчета массовой доли инсулина D_x умножают на 2.

По окружности бумаги для хроматографирования на расстоянии 2 см от центра круга пипеткой наносят по 0,02—0,03 см³ элюата (в четыре точки) и стандартного раствора инсулина (в две точки). Диаметр хроматограммы 20 см. Хроматограммы помещают в мелкие тарелки диаметром около 20 см, куда предварительно наливают систему растворителей (50±5) см³. Бумажный круг соединяют с системой растворителей при помощи фитиля, сделанного из той же бумаги, и накрывают тарелкой.

Процесс хроматографирования осуществляют при температуре 18—25°С в течение 3 ч. По окончании процесса хроматографиро-

вания хроматограмму высушивают под тягой, затем помещают на 10 мин в кювету с красителем. Окрашенную хроматограмму несколько раз промывают в кювете 20 г/дм³ раствором уксусной кислоты (промывной раствор должен быть бесцветным).

Полученная хроматограмма имеет два пятна стандартного раствора и четыре пятна испытуемого раствора. Каждое инсулиновое пятно вырезают, измельчают, помещают в отдельную пробирку и элюируют 4 см³ 0,01 моль/дм³ раствора гидроокиси натрия в течение 20 мин. Элюат колориметрируют при зеленом светофильтре (длина волны 530—540 нм) в кювете с расстоянием между рабочими гранями 10 мм.

3.6.4. *Обработка результатов*

3.6.4.1. Массовую долю инсулина (X_2) в Ед на 1 кг желез вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{D_x \cdot C_c \cdot V \cdot 2}{D_c} \cdot K,$$

где D_x — оптическая плотность исследуемого раствора;

D_c — оптическая плотность стандартного раствора;

C_c — активность в Ед на 1 см³ стандартного раствора;

V — объем элюата, см³;

K — коэффициент пересчета содержания инсулина и инсулиноподобных белков, обладающих гипогликемической активностью в экстракте (для поджелудочной железы крупного рогатого скота — 0,5; свиней — 0,2);

2 — коэффициент пересчета на 1 кг поджелудочной железы.

3.6.4.2. За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, рассчитанное до второго и округленное до первого десятичного знака.

3.6.4.3. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при $P=0,95$ не должно превышать 10% по отношению к среднему арифметическому значению.

3.6.4.4. Допускаемое расхождение между результатами испытаний, проведенных в двух разных лабораториях, при $P=0,95$ не должно превышать 10% по отношению к среднему арифметическому значению.

3.7. Определение массовой доли инсулина иммунореактивным методом

3.7.1. *Аппаратура, материалы, реактивы*

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 общего назначения 3-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 500 г.

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 общего назначения 2-го класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Мясорубка бытовая по ГОСТ 4025.

Микроизмельчитель ткани РТ-1 по ТУ 64—1—1505

Потенциометр с погрешностью измерения не более ±0,05 pH.

Центрифуга лабораторная типа К-23 или аналогичная.

Центрифуга с горизонтальным ротором и охлаждением.

Термостат лабораторный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима 30—50°С.

Гамма-счетчик колодезного типа (Гамма-1, Гамма-2, Гамма-800 или аналогичный).

Пипетки полуавтоматические типа КПД по ТУ П52.706.003.

Наконечники для пипеток по ТУ П58 523.490.

Штатив лабораторный для пробирок.

Термометр стеклянный технический с диапазоном измерения 0—100°С с допускаемой погрешностью измерения ±1°С.

Встряхиватель лабораторный.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Пробирки П4—5—14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Стаканы В-1—250, В-1—600 по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2—50—2, 2—100—2, 2—200—2, 2—1000—2 по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1—100, 1—1000 по ГОСТ 1770.

Ингибитор протеаз (соевый, яичный, «Гордокс» или аналогичный).

Сыворотка крови крупного или мелкого рогатого скота.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч., плотностью 1,19 г/см^3, раствор 0,01 моль/дм^3.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

Аммоний серно-кислый безводный по ГОСТ 3769, х. ч.

Натрий фосфорно-кислый однозамещенный по ГОСТ 245, ч.д.а., раствор 0,2 моль/дм^3.

Натрий фосфорно-кислый двузамещенный по ГОСТ 4172, ч.д.а., раствор 0,2 моль/дм^3.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552, х.ч., плотностью 1,72 г/см^3.

Набор реактивов «РИА—ИНС—ПГ—125$_I$» производства Института биоорганической химии АН БССР.

3.7.2. *Подготовка к испытанию*

3.7.2.1. *Приготовление насыщенного раствора аммония серно-кислого*

516,5 г аммония серно-кислого помещают в колбу вместимостью 1 дм^3, приливают в нее 500 см^3 горячей дистиллирован-

ной воды. После полного растворения соли приготовленный раствор охлаждают до комнатной температуры. Срок хранения раствора 1 мес.

3.7.2.2. *Приготовление иммуноглобулинов, свободных от инсулина*

К 58 см³ сыворотки крови прибавляют 42 см³ насыщенного раствора аммония сернокислого и тщательно перемешивают, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок растворяют в дистиллированной воде в объеме, равном исходному объему сыворотки крови. Таким образом проводят трехкратное переосаждение иммуноглобулинов при вышеуказанных условиях.

Перед последним осаждением в пробирки вместимостью 5 см³ разливают по 2 см³ раствора иммуноглобулинов, а затем в каждую пробирку добавляют по 1,5 см³ насыщенного раствора аммония сернокислого. Содержимое пробирок тщательно перемешивают, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, пробирки оставляют в наклонном положении на фильтровальной бумаге для удаления остатков раствора, после чего пробирки закрывают пробками.

Полученные таким образом иммуноглобулины хранят в морозильной камере бытового холодильника в течение 2 мес. Перед употреблением осадок размораживают и растворяют в 2 см³ дистиллированной воды.

3.7.2.3. *Приготовление фосфатного буфера с pH (7,5±0,1)*

В мерную колбу вместимостью 200 см³ вносят 81,0 см³ раствора натрия фосфорно-кислого двузамещенного концентрации 0,2 моль/дм³ и 19,0 см³ раствора натрия фосфорнокислого однозамещенного концентрации 0,2 моль/дм³. Содержимое колбы перемешивают и измеряют pH. Убедившись, что pH равно (7,5± ±0,1), объем раствора в колбе доводят дистиллированной водой до метки. Раствор хранят при температуре 4°С.

3.7.2.4. *Приготовление фосфатного буфера с pH 7,4, содержащего ингибитор протеаз в количестве 300 ингибирующих единиц в 1 см³*

Приготовление раствора зависит от используемого для проведения анализа ингибитора протеаз. При использовании ингибитора протеаз «Гордокс», содержащего 10000 ингибирующих единиц в 1 см³, 1,5 см³ содержимого ампулы переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³, и доводят объем колбы фосфатным буфером до 50 см³. Раствор должен быть свежеприготовленным и охлажденным до температуры 4°С.

3.7.2.5. *Приготовление подкисленной воды для разведения проб*

В стакан вместимостью 500 см³ наливают 250 см³ дистиллированной воды и при постоянном перемешивании малыми порциями приливают 0,01 моль/дм³ раствор соляной кислоты до достижения в воде pH 4,0 (потенциометрически). Приготовленную таким образом воду хранят в холодильнике при температуре 4°С.

3.7.2.6. *Приготовление 0,05 моль/дм³ раствора фосфатного буфера, содержащего 150 ингибирующих единиц в 1 см³*

В мерную колбу вместимостью 50 см³ вносят 25 см³ фосфатного буфера, содержащего 300 ингибирующих единиц в 1 см³, и объем раствора в колбе доводят подкисленной до pH 4,0 водой до метки. Раствор готовят перед употреблением.

3.7.2.7. *Приготовление первого экстрагирующего раствора*

167 см³ дистиллированной воды смешивают с 833 см³ этилового спирта, а затем к раствору прибавляют 13,6 см³ концентрированной ортофосфорной кислоты. Раствор готовят перед употреблением и охлаждают до температуры 4°С.

3.7.2.8. *Приготовление второго экстрагирующего раствора*

375 см³ дистиллированной воды смешивают с 625 см³ 96-градусного этилового спирта, затем к раствору прибавляют 2,7 см³ концентрированной ортофосфорной кислоты.

3.7.2.9. *Приготовление растворов калибровочных проб, антисыворотки, 125_I-инсулина и буферного раствора*

Растворы калибровочных проб, антисыворотки и 125_I-инсулина готовят из набора реактивов «РИА-ИНС-ПГ—125_I» в соответствии с инструкцией по применению, утвержденной в установленном порядке. Буферный раствор и раствор полиэтиленгликоля в данном наборе реактивов поставляют готовым к употреблению.

3.7.2.10. *Подготовка сырья к испытанию*

Навеску 100 г измельченной поджелудочной железы гомогенизируют в 4-кратном объеме первого экстрагирующего раствора на микроизмельчителе тканей РТ-1 в течение 5 мин при 8000 об/мин, а затем в течение 10 мин при 6000 об/мин. По окончании гомогенизации на РТ-1 измеряют объем полученного гомогената (V_1).

10 см³ гомогената помещают в стакан стеклянного гомогенизатора и продолжают дальнейшее измельчение ткани в течение 10 мин, а затем переносят его в центрифужный стакан или пробирку и центрифугируют в течение (25±5) мин в центрифуге с

охлаждением при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в мерный цилиндр и измеряют ее объем. К осадку приливают второй экстрагирующий раствор в объеме, равном объему надосадочной жидкости, и стеклянной палочкой хорошо перемешивают осадок с раствором. После перемешивания содержимое стакана или центрифужной пробирки переносят в стакан стеклянного гомогенизатора и проводят гомогенизацию осадка в течение 10 мин, не допуская поднятия температуры при гомогенизации в растворе выше 4°С. Гомогенат переносят в центрифужный стакан или пробирку и проводят центрифугирование в течение (25± ±5) мин в центрифуге с охлаждением при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость присоединяют к первому экстракту, перемешивают содержимое цилиндра стеклянной палочкой и измеряют общий объем объединенных экстрактов (V_2).

0,1 см³ объединенного экстракта последовательно разводят охлажденной до 4°С подкисленной до pH 4,0 водой в 10^1, 10^2, 10^3 и 10^4 раз.

Из полученных разведений 10^3 и 10^4 отбирают по 0,25 см³ раствора и смешивают с равным количеством фосфатного буфера, содержащего 300 Ед/см³ ингибитора протеаз.

3.7.3. *Проведение испытания*

В пробирки при комнатной температуре вносят растворы реагентов в последовательности и количестве, указанных в табл. 2.

Таблица 2

см³

Реагенты в порядке их внесения	Количество реагентов, вносимых в пробирки:			
	Т	Н	К	П
Буферный раствор	0,4	0,2	0,1	0,1
125_I-инсулин	0,1	0,1	0,1	0,1
Калибровочные пробы	—	K_0 0,1	0,1	—
Определяемые пробы	—	—	—	0,1
Антисыворотка	—	—	0,1	0,1
Иммуноглобулины	—	—	—	0,1
0,05 моль/дм³ фосфатный буфер	—	0,1	0,1	—

Примечание. Т — общая активность 125_I-инсулина, добавляемого в одну пробирку;
Н — неспецифическое связывание для калибровки;
К — калибровочные пробы;
П — определяемые пробы.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют 3—4 ч при температуре (37±1)°С в термостате. После инкубации в каждую пробирку, кроме пробирок Т, добавляют по 0,8 см³ охлажденного раствора полиэтиленгликоля. Содержимое пробирок интенсивно перемешивают в течение 5 мин на встряхивателе. Все пробирки, кроме пробирок Т, одновременно центрифугируют в центрифуге с горизонтальным ротором и охлаждением в течение 20 мин при 3000 об/мин.

После центрифугирования из всех пробирок кроме пробирок Т, одновременно сливают надосадочную жидкость. Для удаления остатков жидкости пробирки опрокидывают на фильтровальную бумагу.

Все пробирки с осадками и пробирки Т помещают в гамма-счетчик и измеряют скорость счета в каждой пробирке. Время счета 1 мин.

3.7.4. *Обработка результатов*

3.7.4.1. При использовании счетчиков Гамма-800 или фирмы ЛКВ и соответствующей программы расчет концентрации инсулина автоматический.

В случае самостоятельного расчета количество инсулина в 1 см³ разбавленного экстракта находят по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой необходимо провести следующие расчеты.

Находят средние арифметические значения скоростей счета 125_I-инсулина для каждой пары пробирок (B).

Рассчитывают значение $\frac{B}{B_0} \cdot 100\%$ для каждой калибровочной и определяемой пробы,

где B — средняя скорость счета в пробирках, содержащих калибровочные пробы или определяемые образцы, имп/мин;

B_0 — средняя скорость счета в пробирках, содержащих «нулевую» калибровочную пробу, имп/мин.

Рассчитывают значение $\frac{B_0}{T} \cdot 100\%$,

где T — общая активность 125_I-инсулина, добавляемого в одну пробирку, характеризующая связывающую способность антисыворотки или процент связанной метки для нулевого счета в пробирках, содержащих «нулевую» калибровочную пробу.

После проведения расчетов в линейных координатах строят калибровочную кривую, откладывая на ось ординат значение

$\frac{B}{B_0} \cdot 100\%$, а на оси абсцисс — значение концентрации калибровочных проб инсулина в мкЕд/см³, добавленного в одну пробирку. Для определяемых проб экстракта поджелудочной железы на основании соответствующих значений $\frac{B}{B_0} \cdot 100\%$ по калибровочному графику определяют концентрацию инсулина в 1 см³ разбавленного раствора.

Массовую долю инсулина в поджелудочной железе (X_1) в Ед/кг вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{(c_x \cdot n_1) \cdot 2 \cdot V_1 \cdot V_2}{10 \cdot m \cdot 10^3},$$

где c_x — концентрация инсулина, найденная по калибровочному графику для соответствующего разведения, мкЕд/см³;

n_1 — степень разведения экстракта;

V_1 — общий объем экстракта после гомогенизации на РТ-1, см³;

V_2 — общий объем объединенных экстрактов, см³;

10 — объем гомогената, используемый для проведения дополнительной гомогенизации в стеклянном гомогенизаторе, см³;

10^6 — коэффициент перевода единиц мкЕд/см³ в Ед/кг;

m — масса навески измельченной поджелудочной железы, кг.

3.7.4.2. За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, рассчитанное до второго и округленное до первого десятичного знака.

3.7.4.3. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений при $P=0,95$ не должно превышать 17% по отношению к среднему арифметическому значению.

3.7.4.4. Допускаемое расхождение между результатами испытаний, проведенных в двух разных лабораториях, при $P=0,95$ не должно превышать 20% по отношению к среднему арифметическому значению.

4. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

4.1. Транспортирование

Замороженные поджелудочные железы транспортируют всеми видами транспорта при температуре не выше минус 20°С в соответствии с правилами перевозок скоропортящихся грузов, действующими на соответствующем виде транспорта.

Транспортирование замороженных поджелудочных желез в пакетированном виде — по ГОСТ 24597, ГОСТ 21650, ГОСТ 26663.

4.2. Хранение

Замороженные поджелудочные железы хранят в упакованном виде в камере при температуре не выше минус 20°С.

Срок хранения замороженных поджелудочных желез — 6 мес с момента сбора.

Хранение замороженных поджелудочных желез на складах транспортных организаций не допускается.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта
ГОСТ 61—75	3.6.1	ГОСТ 21650—76	4.1
ГОСТ 245—76	3.7.1	ГОСТ 23094—78	3.5.1
ГОСТ 1770—74	3.6.1, 3.7.1	ГОСТ 24104—88	3.4.1, 3.5.1, 3.6.1, 3.7.1
ГОСТ 3117—78	3.6.1		
ГОСТ 3118—77	3.6.1, 3.7.1	ГОСТ 24597—81	4.1
ГОСТ 3760—79	3.6.1	ГОСТ 25336—82	3.4.1, 3.5.1, 3.6.1, 3.7.1
ГОСТ 3769—78	3.7.1		
ГОСТ 3773—72	3.6.1	ГОСТ 26663—85	4.1
ГОСТ 4025—83	3.6.1, 3.7.1	ТУ 6—02—1244—83	3.4.1
ГОСТ 4165—78	3.6.1		
ГОСТ 4172—76	3.7.1	ТУ 6—09—1926—77	3.6.1
ГОСТ 4204—77	3.5.1, 3.6.1		
ГОСТ 4328—77	3.6.1, 3.7.1	ТУ 6—09—3719—74	3.6.1
ГОСТ 5556—81	3.6.1		
ГОСТ 5830—79	3.5.1	ТУ 46—22—761—77	3.5.1
ГОСТ 5962—67	3.6.1, 3.7.1		
ГОСТ 6006—78	3.6.1	ТУ 6—05—211—971—75	3.6.1
ГОСТ 6552—80	3.7.1		
ГОСТ 6709—72	3.6.1, 3.7.1	ТУ 64—1—1505—79	3.7.1
ГОСТ 9412—77	3.6.1		
ГОСТ 10354—82	1.3.2	ТУ П52.706.003.81	3.7.1
ГОСТ 12026—76	3.4.1, 3.6.1, 3.7.1	ТУ П58.523.490.75	3.7.1
ГОСТ 13361—84	1.3.1	ТУ 7506804—97—90	3.4.1
ГОСТ 13513—86	1.3.1		
ГОСТ 14192—77	1.2.2		
ГОСТ 20469—81	3.6.1		

Редактор **М. И. Максимова**
Технический редактор **Н. С. Гришанова**
Корректор **В. И. Кануркина**

Сдано в наб. 22.05.95. Подп. в печ. 26.07.95. Усл. п. л. 1,40. Усл. кр.-отт. 1,40. Уч.-изд. л. 1,26. Тир. 330 экз. С 2684

gost.e-ecolog.ru

ИПК Издательство стандартов, 107076, Москва, Колодезный пер., 14.
Филиал ИПК Издательство стандартов — тип. «Московский печатник», Москва, Лялин пер., 6. Зак. 566