Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы определения глютена в продовольственном сырье и пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.1.2880—11

Издание официальное

Москва • 2011

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы определения глютена в продовольственном сырье и пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.1.2880—11

ББК 51.23
М54

М54 Методы определения глютена в продовольственном сырье и пищевых продуктах: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—32 с.

ISBN 978—5—7508—1031—4

1. Разработаны Учреждением Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт питания (В. А. Тутельян, И. Я. Конь, Н. М. Шилина, А. А. Милюкова, Е. А. Нетунаева); ООО «Компания Стайлаб» (А. В. Галкин).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 02.06.2011 № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 26 июня 2011 г.

4. Введены в действие с 26 июня 2011 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.23

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 20.10.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,0

Тираж 200 экз. Заказ 136

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

Введение ... 4
1. Область применения ... 5
2. Сущность метода ... 5
3. Средства измерения, оборудование, посуда, реактивы и материалы ... 8
3.1. Средства измерения, лабораторная посуда и вспомогательное оборудование ... 8
3.2. Реактивы и материалы ... 9
3.3. Состав тест-системы, подобной RIDASCREEN® Gliadin или аналога ... 10
3.4. Состав тест-системы, подобной RIDASCREEN® FAST Gliadin или аналога ... 11
3.5. Состав тест-системы, подобной RIDASCREEN® Gliadin competitive или аналога ... 12
3.6. Состав тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin или с аналогичными характеристиками ... 13
4. Требования к выполнению анализов ... 14
4.1. Общие требования к безопасности ... 14
4.2. Требования к работе оператора ... 14
4.3. Условия выполнения измерений ... 14
5. Подготовка к проведению испытаний ... 14
5.1. Отбор проб ... 14
5.2. Подготовка лабораторной посуды и помещения ... 15
5.3. Подготовка приборов к работе ... 15
5.4. Подготовка реагентов к анализу ... 15
6. Проведение анализа при использовании тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin или аналогов ... 17
6.1. Подготовка проб к анализу ... 17
6.2. Проведение анализа ... 19
6.3. Обработка результатов анализа ... 20
7. Проведение анализа при использовании тест-систем, подобных RIDASCREEN® FAST Gliadin или аналогов ... 21
7.1. Подготовка проб к анализу ... 21
7.2. Проведение анализа ... 23
7.3. Обработка результатов анализа ... 24
8. Проведение анализа при использовании тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin competitive или аналогов ... 26
8.1. Подготовка проб к анализу ... 26
8.2. Проведение анализа ... 26
8.3. Обработка результатов анализа ... 28
9. Проведение анализа при использовании тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin или с аналогов ... 29
9.1. Подготовка к анализу ... 29
9.2. Проведение анализа ... 30
9.3. Интерпретация результатов анализа ... 31
10. Проверка приемлемости результатов параллельных измерений ... 31
11. Оформление результатов измерений ... 32

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
26 июня 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы определения глютена в продовольственном сырье и пищевых продуктах

Методические указания МУК 4.1.2880—11

Введение

Глютен, содержащийся в злаковых культурах (в пшенице, ржи, ячмене и овсе), представляет собой смесь растительных белков – проламинов и глютелинов. Проламин пшеницы – это глиадин, проламин ржи – секалин, проламин ячменя – гордеин, овса – авенин.

Наряду с глютеном, являющимся естественным компонентом некоторых видов зерновых, глютен может быть внесен в продукты специально в качестве связующей, текстурирующей и влагоудерживающей пищевой добавки.

Контроль содержания количества глютена в пищевых продуктах играет ключевую роль в обеспечении качества пищевых продуктов, предназначенных для больных целиакией – хроническим, прогрессирующим, наследственно обусловленным заболеванием, характеризующимся стойкой непереносимостью глютена злаковых культур (пшеницы, ржи, ячменя и овса) с развитием атрофии слизистой тонкой кишки и связанного с ней синдрома мальабсорбции. При выявлении непереносимости глютена у детей или взрослых необходимо пожизненное назначение специальной безглютеновой диеты. Рутинный контроль уровня глютена также необходим в продуктах прикорма, предназначенных для детей раннего возраста, в целях профилактики развития у них целиакии, аллергии и другой патологии.

В соответствии с требованиями стандарта ALINORM 08/31/26, подготовленного Комитетом Кодекса Алиментариус по питанию и пищевым продуктам для специальных диет (CCNFSD) продукты специализированного питания с пониженным содержанием глютена, должны содержать 20—100 мг/кг глютена, а безглютеновые продукты питания не должны содержать более чем 20 мг/кг глютена и должны маркироваться как «безглютеновые» («gluten-free»).

Как правило, содержание глиадинов в глютене находится на уровне 50 %, поэтому 20 мг/кг глютена (0,002 %) соответствует предельная концентрация глиадина 10 мг/кг (0,001 %).

В соответствии с требованиями стандарта ALINORM 08/31/26 определение глютена должно выполняться с помощью иммуноферментного метода анализа с использованием моноклональных антител R5 и обеспечивать предел обнаружения не более чем 10 мг/кг глютена в товарном образце.

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методы количественного и качественного определения проламинов пшеницы, ржи и ячменя (глиадина):

- в готовых пищевых продуктах и полуфабрикатах, относящихся к пищевым продуктам диетического (лечебного и профилактического) питания;
- в сырье и ингредиентах, которые используются для производства или приготовления пищевых продуктов диетического (лечебного и профилактического) питания;
- в образцах, взятых с поверхности оборудования и рабочих поверхностей в производственных помещениях безглютеновых производств.

1.2. Методические указания предназначены для органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также могут быть использованы для проведения производственного контроля другими испытательными лабораториями, аккредитованными в установленном порядке.

2. Сущность метода

2.1. Метод основан на обнаружении глиадина в подготовленной соответствующим образом пробе путем постановки иммунохимических тестов.

2.2. Антитела, используемые в иммунологическом методе, реагируют с фракциями белков зерновых культур, обладающих токсичностью для людей с непереносимостью глютена и, в то же время, не реагируют с другими белками зерновых культур или другими компонентами, содержащимися в пищевых продуктах или ингредиентах.

2.3. Для количественного определения глютена применяются иммуноферментный метод анализа (ИФА) с использованием моноклональных антител R5, специфичных к глютену. Для качественного определения глютена применяют иммунохроматографические тест-полоски.

2.4. При иммуноферментном методе анализа определение глютена происходит за счет специфического взаимодействия проламинов пшеницы, ржи и ячменя (глиадинов), которые содержатся в исследуемом материале, с антителами к глиадину, адсорбированными на планшете. К образовавшемуся комплексу «антитело–антиген» добавляют раствор конъюгата, содержащего антитела к глиадину с ферментом. Образуется новый комплекс «антитело–антиген–антитело+фермент» После добавления субстрата и хромогена происходит химическое взаимодействие, при котором ферментный фрагмент молекулы коньюгата выступает в качестве катализатора, и образуются окрашенные продукты реакции.

Образующийся аналитический сигнал, зависящий от результатов взаимодействия комплекса «антитело–антиген» с конъюгатом на поверхности ячеек планшета, измеряется по регистрируемому значению оптической плотности при длине волны 450 нм, а затем пересчитывают на глютен.

2.5. В процессе иммунохроматографического анализа реагенты мигрируют по мембране тест-полоски, пропитанной антителами к глиадину в фиксированной и свободной форме. Молекулы глиадина связываются с антителами, нанесенными на подвижные микрочастички красного цвета. Образующийся иммунохимический комплекс «антитело–антиген» глиадина с микрочастичками переносится капиллярными силами по мембране в зону, где нанесены зафиксированные на поверхности антитела к глиадину. В этой части полоски, называемой реакционной зоной, микрочастички с глиадином иммуносорбируются антителами на поверхности мембраны, в результате чего на мембране появляется полоска красного цвета.

Несвязанные окрашенные частички перемещаются далее по мембране и сорбируются в другой её части, называемой «контрольной». Появляющаяся в контрольной зоне мембраны полоска голубого цвета подтверждает правильность испытания.

Результат оценивается визуально.

2.6. Для количественного определения глютена в пищевых продуктах используют иммуноферментные тест-системы, подобные RIDASCREEN® Gliadin или с аналогичными характеристиками.

Для количественного определения глютена в пищевых продуктах для производственного контроля используют иммуноферментные тест-системы, подобные RIDASCREEN® FAST Gliadin или с аналогичными характеристиками.

Для анализа ферментированных и гидролизованных продуктов питания (пиво, сироп, крахмал, солодовый экстракт, дрожжевое тесто, соевый соус) методом конкурентного иммуноферментного анализа используют иммуноферментные тест-системы, подобные RIDASCREEN® Gliadin competitive или с аналогичными характеристиками.

Для оценки чистоты рабочей зоны при определении глютена и при производстве безглютеновых продуктов, а также для экспресс-определения глютена в пищевых продуктах используют иммунохроматографические тест-полоски, подобные RIDA® QUICK Gliadin или с аналогичными характеристиками.

Таблица 1

Спецификация наборов для определения глиадина

	RIDASCREEN® Gliadin	RIDASCREEN® FAST Gliadin	RIDASCREEN® Gliadin competitive	RIDA® QUICK Gliadin
Формат	Стрипованный планшет, 96 лунок	Стрипованный планшет, 48 лунок	Стрипованный планшет, 96 лунок	25 тест-полосок
Стандарты	0/ 5/ 10/ 20/ 40/ 80 мкг/л	0/ 10/ 20/ 40/ 80 мкг/л	0, 10/ 30/ 90/ 270/ нг/мл	Контроль на полосе
Затраты времени на пробоподготовку, мин	120	20	30	30
Время анализа, мин	90	30	40	5
Предел обнаружения	1,5 мг/кг глиадина	2 мг/кг глиадина	2,5 мг/кг глиадина	2,5 мг/кг глиадина при исследовании поверхностей – 0.5 мкг глиадина на 100 см^2

2.7. Метрологические характеристики метода, установленные для разных наборов, подобных RIDASCREEN®, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Метрологические характеристики метода

Метрологические характеристики	Тест-система RIDASCREEN® Gliadin			Тест-система RIDASCREEN® FAST Gliadin			Тест-система RIDASCREEN® Gliadin competitive		
	Диапазон измерений концентрации глютена, мг/кг (мг/дм³)								
	3,0—15,0	15,0—40,0	40,0—80,0	4,0—15,0	15,0—40,0	40,0—80,0	5,0—15,0	15,0—90,0	90,0—270,0
Полнота извлечения вещества, %	Не менее 90								
Показатель точности, $\pm\Delta$, мг/кг (мг/дм³), $P = 0,95$	0,7	4,0	6,0	0,9	5,0	6,0	0,8	3,9	7,0
Предел повторяемости, $r_{отн.}$, мг/кг	0,7	2,3	3,0	0,8	2,4	3,2	0,7	3,2	5,6
Предел воспроизводимости, $R_{отн.}$, мг/кг	0,8	2,5	3,1	0,9	2,9	3,6	0,8	3,8	5,9

3. Средства измерения, оборудование, посуда, реактивы и материалы

3.1. Средства измерения, лабораторная посуда и вспомогательное оборудование

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

Центрифуга лабораторная с эффективностью центрифугирования ≥ 2 500 g

Лабораторная мельница (гомогенизатор) типа Ultra Turrax или диспергатор

Водяная баня с диапазоном рабочей температуры 20—100 °С

Лабораторный шейкер (встряхиватель) для пробирок типа Multi reax	
Лабораторный шейкер типа Вортекс (Vortex)	
Автоматические пипеточные дозаторы одноканальные с диапазоном объема доз 10—5 000 мм^3 и дискретностью установки доз 25 мм^3, с наконечниками	ТУ 9452-001-33189998—95
Автоматические регулируемые одноканальные дозаторы с диапазоном объема доз 20—200 мм^3, 0,5—5 см^3, 1—10 см^3	ТУ 9452-001-33189998—95
и восьмиканальные дозаторы с диапазоном объема доз 50—300 мм^3, с наконечниками	ТУ 64-16-55—90
Весы лабораторные аналитические не ниже 2-го класса точности	ГОСТ 24104—2001
Пробирки стерильные с закручивающимися пробками вместимостью 10 см^3	
Цилиндры мерные вместимостью 10 и 100 см^3	ГОСТ 1770
Коническая колба на 100 и 200 см^3	ГОСТ 23932—90
Ступка фарфоровая с пестиком	ГОСТ 9147—80

Допускается использование оборудования, приборов и средств измерений, закупаемых по импорту, зарегистрированных в Госреестре Российской Федерации, соответствующих перечисленным техническим характеристикам и позволяющих воспроизводить метрологические характеристики, указанные в настоящих методических указаниях.

3.2. Реактивы и материалы

Тест-системы, подобные RIDASCREEN® Gliadin или с аналогичными характеристиками	
Тест-системы, подобные RIDASCREEN® FAST Gliadin или с аналогичными характеристиками	
Тест-системы, подобные RIDASCREEN® Gliadin competitive или с аналогичными характеристиками	
Тест-полоски, подобные RIDA® QUICK Gliadin или с аналогичными характеристиками	
Коктейль Мендеса или аналог	
RIDA® Extraction solution или аналог	
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ 11547—80
Спирт изопропиловый	ГОСТ 9805—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72

Обезжиренное сухое молоко ГОСТ 4495—87
Рыбный желатин (конц. ~ 45 % в воде, мол. вес ~ 60 kDa), выпускаемой фирмой Sigma-Aldrich или аналог
Раствор поливинилпирролидона $((C_6H_9NO)_m$ мол. вес ~ 10 000), выпускаемой фирмой Sigma-Aldrich или аналог
Набор стандартных образцов с сертифицированным содержанием глиадина

3.3. Состав тест-системы, подобной RIDASCREEN® Gliadin или аналога

3.3.1. Тест-система иммуноферментная для количественного определения глиадина пшеницы и родственных проламинов ржи и ячменя в пищевых продуктах представляет собой набор, состоящий из:

1. Микротитровального планшета на 96 лунок (12 × 8), сенсибилизированных антителами R5 к глиадину;

2. Комплекта стандартных растворов* глиадина со следующими концентрациями: 0 мкг/дм^3, 5 мкг/дм^3, 10 мкг/дм^3, 20 мкг/дм^3, 40 мкг/дм^3, 80 мкг/дм^3, по 1,3 см^3 каждого;

3. Раствора коньюгата антител с пероксидазой, концентрированного, 1,2 см^3;

4. Пероксида карбамида, субстрата, 7 см^3;

5. Тетраметилбензидина, хромогена, 7 см^3;

6. 1 н серной кислоты, стоп-реагента, 14 см^3;

7. Разбавляющего буферного раствора, 5-кратного концентрата, 60 см^3;

8. Моющего буферного раствора, 10-кратного концентрата, 100 см^3.

3.3.2. В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений (включая калибровку по стандартным растворам). Реагенты в составе одного набора не заменяют реагентами из другого набора с другим номером партии. Разбавление или замена реагентов недопустима, т. к. приводит к потере чувствительности.

3.3.3. Набор хранят при температуре 2—8 °С, не замораживают. Перед использованием набора температуру всех реагентов и подготовленных для анализа растворов доводят до комнатной (около 1,5—2,0 ч). После использования все оставшиеся реагенты немедленно охлаждают

---

* Стандартные растворы откалиброваны по Европейскому стандартному образцу на глиадин (European Reference Gliadin Standard).

до температуры 2—8 °С. Число повторных охлаждений ограничено сроком годности набора.

Набор с истекшим сроком годности не используют. Неиспользованные стрипы (лунки) хранят в оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся осушителем. Избегают попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором хромогена. Избегают контакта с кожей стоп-реагента, который содержит в своем составе серную кислоту, и буфера, который содержит тимеросол.

В случае окрашивания раствора хромогена его не используют, поскольку окрашивание раствора является признаком его порчи.

3.4. Состав тест-системы, подобной RIDASCREEN® FAST Gliadin или аналога

3.4.1. Тест-система иммуноферментная для определения глиадина пшеницы и родственных проламинов ржи и ячменя в пищевых продуктах для производственного контроля представляет собой набор, состоящий:

- из микротитровального планшета на 48 лунок (6 × 8), сенсибилизированных антителами R5 к глиадину;
- из комплекта стандартных растворов* глиадина со следующими концентрациями: 0 мкг/дм^3, 10 мкг/дм^3, 20 мкг/дм^3, 40 мкг/дм^3, 80 мкг/дм^3, по 1,3 см^3 каждого;
- из раствора коньюгата антител с пероксидазой, концентрированного, 0,7 см^3;
- из пероксида карбамида, субстрата, 7 см^3;
- из тетраметилбензидина, хромогена, 7 см^3;
- из 1 н серной кислоты, стоп-реагента, 14 см^3;
- из разбавляющего буферного раствора, 5-кратного концентрата, 60 см^3;
- из моющего буферного раствора, 10-кратного концентрата, 100 см^3.

3.4.2. В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 48 определений (включая калибровку по стандартным растворам). Реагенты в составе одного набора не заменяют реагентами из другого набора с другим номером партии. Разбавление или замена реагентов недопустима, т. к. приводит к потере чувствительности.

3.4.3. Набор хранят при температуре 2—8°С, не замораживают. Перед использованием набора температуру всех реагентов и подготовлен-

---

* Стандартные растворы откалиброваны по Европейскому стандартному образцу на глиадин (European Reference Gliadin Standard).

ных для анализа растворов доводят до комнатной (около 1,5—2,0 ч). После использования все оставшиеся реагенты немедленно охлаждают до температуры 2—8 °С. Число повторных охлаждений ограничено сроком годности набора.

Набор с истекшим сроком годности не используют. Неиспользованные стрипы (лунки) хранят в оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся осушителем. Избегают попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором хромогена. Избегают контакта с кожей стоп-реагента, который содержит в своем составе серную кислоту, и буфера, который содержит тимеросол.

В случае окрашивания раствор хромогена не используют, поскольку окрашивание раствора является признаком его порчи.

3.5. Состав тест-системы, подобной RIDASCREEN® Gliadin competitive или аналога

3.5.1. Тест-система иммуноферментная для анализа ферментированных и гидролизованных продуктов питания (пиво, сироп, крахмал, солодовый экстракт, дрожжевое тесто, соевый соус) представляет собой набор, состоящий:

- из микротитровального планшета на 96 лунок (12 × 8), сенсибилизированных антителами к глиадину;
- из комплекта стандартных растворов* гидролизатов проламинов со следующими концентрациями (готовы к использованию): 0 нг/см^3, 10 нг/см^3, 30 нг/см^3, 90 нг/см^3, 270 нг/см^3, по 1,3 см^3 каждого;
- из раствора коньюгата антител с пероксидазой, концентрированного, 0,7 см^3;
- из субстрата (хромогена), красного цвета, 10 см^3;
- из 1 н серной кислоты, стоп-реагента, 14 см^3;
- из разбавляющего буферного раствора, 5-кратного концентрата, желтого цвета, 60 см^3;
- из моющего буферного раствора, 10-кратного концентрата, 100 см^3.

3.5.2. В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 96 определений (включая калибровку по стандартным растворам). Реагенты в составе одного набора не заменяют реагентами из другого набора с другим номером партии. Разбавление или замена реагентов недопустима, т. к. приводит к потере чувствительности.

---

* Стандартные растворы откалиброваны по Европейскому стандартному образцу на глиадин (European Reference Gliadin Standard).

3.5.3. Набор хранят при температуре 2—8 °С, не замораживают. Перед использованием набора температуру всех реагентов и подготовленных для анализа растворов доводят до комнатной (около 1,5—2 ч). После использования все оставшиеся реагенты немедленно охлаждают до температуры 2—8 °С. Число повторных охлаждений ограничено сроком годности набора.

Набор с истекшим сроком годности не используют. Неиспользованные стрипы (лунки) хранят в оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся осушителем. Избегают попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором хромогена. Избегают контакта с кожей стоп-реагента, который содержит в своем составе серную кислоту.

В случае голубого окрашивания раствор хромогена не используют, поскольку окрашивание раствора является признаком его порчи.

3.6. Состав тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin или с аналогичными характеристиками

3.6.1. Тест-полоски иммуноферментные для количественного определения глиадина пшеницы и родственных проламинов ржи и ячменя в пищевых продуктах представляет собой набор, состоящий:

- из тест-полосок (по одной на каждое определение), 25 шт.;
- из разовых пипеток, 25 шт.;
- из пробирок, 30 шт.;
- из разбавляющего буферного раствора, 5-кратного концентрата, 60 $см^3$.

3.6.2. В состав набора входят материалы и реагенты в количестве, достаточном для выполнения 25 определений. Реагенты в составе одного набора не заменяют реагентами из другого набора с другим номером партии. Разбавление или замена реагентов недопустима, т. к. приводит к потере чувствительности.

3.6.3. Набор хранят при температуре 2—8 °С, не замораживают. Перед использованием набора температуру всех реагентов и подготовленных для анализа растворов доводят до комнатной (около 1,5—2.0 ч). Число повторных охлаждений ограничено сроком годности набора.

Набор с истекшим сроком годности не используют. Неиспользованные тест-полосоки упаковывают в оригинальный контейнер и хранят в закрытом контейнере при комнатной температуре (20—25 °С) в сухом месте. Срок годности тест-полосок нанесен на этикетку, тест-полоски с истекшим сроком годности не используют.

4. Требования к выполнению анализов

4.1. Общие требования к безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с вредными веществами по ГОСТ 12.1.007 и 12.1.005—88; требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019; помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009; помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

Организация обучения безопасности труда исполнителей осуществляется по ГОСТ 12.0.004. Исполнители должны быть проинструктированы о мерах безопасности.

При выполнении анализов необходимо соблюдать требования, изложенные в технической документации на планшетный иммуноферментный анализатор (планшетный фотометр, ридер), центрифугу лабораторную, лабораторный шейкер (встряхиватель) типа Multi reax, лабораторный шейкер типа Вортекс, лабораторную мельницу (гомогенизатор) типа Ultra Turrax (или диспергатор) и водяную баню.

4.2. Требования к работе оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения анализа, освоившие метод анализа и уложившиеся в нормативы контроля при выполнении процедур контроля точности измерений.

4.3. Условия выполнения измерений

Температура окружающего воздуха (20 ± 5) °С.
Атмосферное давление 84—106 кПа.
Относительная влажность не более 80 %.

5. Подготовка к проведению испытаний

5.1. Отбор проб

Отбор проб отдельных видов продуктов для анализа проводят в соответствии с действующей нормативно-технической документацией на данную продукцию. Образцы в невскрытой продовольственной таре хранятся в соответствии с условиями хранения, вынесенными на этикетку. Вскрытые образцы дальнейшему хранению не подлежат из-за возможного загрязнения глютеном.

5.2. Подготовка лабораторной посуды и помещения

Для предотвращения получения ложноположительных результатов анализа вследствие возможного загрязнения рабочей зоны, воздуха, рук, лабораторной посуды, оборудования, воды и реагентов глиадином необходимо:

- осуществлять пробоподготовку и выполнение анализа в разных комнатах;
- выполнять анализ в разовых резиновых перчатках;
- промывать поверхности рабочей зоны, все рабочие поверхности лабораторного оборудования (мельницы, гомогенизатора и т. д.) и стеклянную посуду 60—80 %-м раствором этилового или изопропилового спирта перед началом анализа и после каждой процедуры, перед началом последующего анализа, а для проверки чистоты можно использовать тест-полоски, подобные RIDA® QUICK Gliadin (п. 9) или с аналогичными характеристиками;
- тщательно очищать оборудование от остатков предыдущей пробы перед анализом последующей во избежание перекрестного загрязнения.

5.3. Подготовка приборов к работе

Подготовку и проверку планшетного иммуноферментного анализатора (планшетного фотометра, ридера), центрифуги лабораторной, лабораторного шейкера (встряхивателя) типа Multi reax, лабораторного шейкера типа Вортекс, лабораторной мельницы (гомогенизатора) типа Ultra Turrax (или диспергатора) и водяной бани проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническим описанием к приборам.

5.4. Подготовка реагентов к анализу

Реагенты готовят в другом помещении, чтобы избежать необратимого загрязнения их материалом проб.

5.4.1. Разбавляющий буферный раствор

Разбавляющий буферный раствор поставляется в концентрированном виде (5-кратный концентрат). Количество необходимого буферного раствора следует оценивать по потребности. Для приготовления рабочего раствора концентрированный разбавляющий буферный раствор разбавляют дистиллированной водой, не загрязненной глиадиновой пылью, в 5 раз. Готовят только необходимое количество буферного раствора.

5.4.2. Раствор коньюгата

Раствор коньюгата поставляется в концентрированном виде. Перед разбавлением концентрированного раствора коньюгата осторожно встряхивают содержимое флакона.

Для приготовления рабочего раствора концентрированный раствор коньюгата разбавляют дистиллированной водой, не загрязненной глиадиновой пылью, в отношении 1 : 10 (например, смешивают 0,1 $см^3$ концентрата коньюгата с 1 $см^3$ воды). Поскольку разбавленный раствор коньюгата имеет ограниченную стабильность следует готовить раствор непосредственно перед применением по потребности.

5.4.3. Моющий буферный раствор

Моющий буферный раствор поставляется в концентрированном виде (10-кратный концентрат). Перед разбавлением моющего буферного раствора полностью растворяют кристаллы, которые могут образоваться во флаконе с концентрированным раствором при его хранении. Для этого помещают флакон в водяную баню при температуре 37 °С до растворения кристаллов.

Для приготовления рабочего раствора концентрированный моющий буферный раствор разбавляют дистиллированной водой, не загрязненной глиадиновой пылью, в 10 раз. Готовый моющий буферный раствор стабилен в течение 4 недель при температуре 2—8 °С.

5.4.4. Растворы спиртов

80 %-й раствор этилового спирта

Мерным цилиндром отмеряют 80 $см^3$ этилового спирта и 20 $см^3$ дистиллированной воды, переносят в колбу и тщательно перемешивают. Срок хранения – 1 месяц в темном прохладном месте.

60 %-й раствор этилового спирта

Мерным цилиндром отмеряют 60 $см^3$ этилового спирта и 40 $см^3$ дистиллированной воды, переносят в колбу и тщательно перемешивают. Срок хранения – 1 месяц в темном прохладном месте.

68 %-й раствор изопропилового спирта

Мерным цилиндром отмеряют 68 $см^3$ этилового спирта и 32 $см^3$ дистиллированной воды, переносят в колбу и тщательно перемешивают. Срок хранения – 1 месяц в темном прохладном месте.

5.4.5. Раствор рыбного желатина

Для тест-систем, подобных RIDASCREEN® FAST Gliadin и тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin

В мерном цилиндре на 100 $см^3$ смешивают 11,1 $см^3$ рыбного желатина, 20 $см^3$ дистиллированной воды и (2 ± 0,0001) г поливинилпирролидона.

Доводят объем раствора дистиллированной водой до 40 $см^3$, затем добавляют 60 $см^3$ этилового спирта. Приготовленный раствор стабилен в течение 3—4 недель при комнатной температуре. Раствор хорошо перемешивают перед его использованием.

Для тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin competitive

В мерном цилиндре на 100 $см^3$ смешивают 30 $см^3$ дистиллированной воды и (10 ± 0,0001) г рыбного желатина и хорошо перемешивают. Добавляют 60 $см^3$ этилового спирта, перемешивают, доводят pH раствора до 8,5 и дистиллированной водой доводят объем до 100 $см^3$.

Приготовленный раствор стабилен в течение 3—4 недель при комнатной температуре. Раствор хорошо перемешивают перед использованием.

6. Проведение анализа при использовании тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin или аналогов

6.1. Подготовка проб к анализу

Твердые образцы. Берут (5 ± 0,01) г образца и тщательно гомогенизируют с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или ступки фарфоровой с пестиком до порошкообразного состояния.

Образцы с неоднородным распределением глютена (например, сосиски и другие мясные продукты). В таких образцах глютен может быть распределен неравномерно, поэтому для обеспечения представительности анализа гомогенизируют минимум (50 ± 0,01) г пробы.

Вязкие и жидкие образцы тщательно перемешивают в течение 30 с.

Экстракцию глиадина проводят или с помощью коктейля Мендеса, или с помощью RIDA® Extraction solution, или с помощью аналогов.

6.1.1. Экстракция с помощью коктейля Мендеса или аналога

Твердые образцы. Смешивают в пробирке (0,25 ± 0,0001) г гомогенизированной пробы и 2,5 $см^3$ коктейля Мендеса или аналога.

Жидкие образцы. Смешивают в пробирке 0,25 $см^3$ гомогенизированной пробы и 2,5 $см^3$ коктейля Мендеса или аналога.

Образцы, содержащие таннин и полифенолы (например, какао, шоколад, чай, кофе, чечевица и др.). Смешивают в пробирке (0,25 ± 0,0001) г гомогенизированной пробы, (0,25 ± 0,0001) г обезжиренного сухого молока и 2,5 $см^3$ коктейля Мендеса или аналога. Рекомендуется проверять сухое молоко на отсутствие примеси глютена с помощью тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin или аналога (п. 9) перед его внесением в образец или непосредственно во время опыта в качестве дополнитель-

ного образца. При положительных результатах сухое молоко следует заменить и повторить опыт.

Пробирки хорошо закрывают крышками и тщательно перемешивают на лабораторном шейкере типа Вортекс.

Инкубируют пробирки на водяной бане в течение 40 мин при температуре 50 °С.

В охлажденные пробирки вносят 7,5 см^3 80 %-го раствора этилового спирта, закрывают крышку и снова тщательно перемешивают на лабораторном шейкере типа Вортекс.

Встряхивают пробирки в течение 60 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax для пробирок при комнатной температуре, переворачивая их.

Пробирки центрифугируют при ≥ 2 500 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

Надосадок переносят в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Экстракты хранят в плотно закрытых пробирках в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте.

Далее следуют п. 6.2.

6.1.2. Экстракция с помощью RIDA® Extraction solution или аналога

Твердые образцы. Смешивают в пробирке (0,25 ± 0,0001) г гомогенизированной пробы и 2,5 см^3 RIDA® Extraction solution или аналога.

Жидкие образцы. Смешивают в пробирке 0,25 см^3 гомогенизированной пробы и 2,5 см^3 RIDA® Extraction solution или аналога.

Образцы, содержащие таннин и полифенолы (например, какао, шоколад, чай, кофе, чечевица и др.). Смешают в пробирке (0,25 ± 0,0001) г гомогенизированной пробы, (0,25 ± 0,0001) г обезжиренного сухого молока и 2,5 см^3 RIDA® Extraction solution или аналога. Рекомендуется проверять сухое молоко на отсутствие примеси глютена с помощью тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin или аналога (п. 9) перед его внесением в образец или непосредственно во время опыта в качестве дополнительного образца. При положительных результатах сухое молоко следует заменить и повторить опыт.

Пробирки плотно закрывают крышками и тщательно перемешивают на лабораторном шейкере типа Вортекс.

Инкубируют пробирки на водяной бане в течение 15 мин при температуре 60 °С, затем охлаждают до комнатной температуры.

В охлажденные пробирки вносят 7,5 см^3 68 %-го раствора изопропилового спирта и повторно инкубируют пробирки в течение 10 мин при температуре 60 °С на водяной бане.

Центрифугируют пробирки при ≥ 2 500 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

Надосадок переносят в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Надосадок хранят в плотно закрытых пробирках в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте.

Далее следуют п. 6.2.

6.2. Проведение анализа

Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета.

На всех стадиях инкубации избегают воздействия прямого солнечного света (при инкубации рекомендуется прикрыть планшет крышкой).

6.2.1. Приготовление рабочих растворов исследуемых образцов

Экстракты из проб продуктов, полученные по п. 6.1.1 и 6.1.2 разбавляют готовым разбавляющим буферным раствором (п. 5.4) в 12,5 раз (смешивают 0,08 $см^3$ экстракта и 0,92 $см^3$ готового разбавляющего буферного раствора).

Для анализа используют 0,10 $см^3$ рабочего раствора исследуемых образцов на лунку планшета.

6.2.2. Проведение испытаний

6.2.2.1. В рамку планшета вставляют лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов, записывают в таблицу.

6.2.2.2. С помощью дозатора пипеточного добавляют по 0,10 $см^3$ стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок и помещают планшет на инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре.

6.2.2.3. По окончании сорбции выполняют промывку планшета. Для этого удаляют жидкость из лунок встряхиванием перевернутого планшета и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Далее наполняют лунки 0,25 $см^3$ моющего буферного раствора (п. 5.4) и снова выливают жидкость. Выбивают капельки жидкости как описано выше и повторяют процедуру отмывки лунок моющим буферным раствором еще 2 раза.

6.2.2.4. С помощью дозатора пипеточного добавляют в каждую лунку по 0,10 см^3 готового раствора коньюгата (п. 5.4). Осторожно перемешивают вручную и оставляют на инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре.

Далее выполняют промывку планшета по п. 6.2.2.3.

6.2.2.5. С помощью дозатора пипеточного добавляют по 0,05 см^3 субстрата и по 0,05 см^3 хромогена в каждую лунку. Осторожно перемешивают вручную и инкубируют в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре.

6.2.2.6. С помощью дозатора пипеточного добавляют в каждую лунку по 0,10 см^3 стоп-реагента и осторожно перемешают вручную.

6.2.2.7. В течение 30 мин после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке.

6.3. Обработка результатов анализа

6.3.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на вертикальном фотометре при длине волны 450 нм («бланк» или нулевое считывание по воздуху).

Результаты записей оптической плотности переносят в таблицу и располагают в соответствии с номерами образцов.

6.3.2. Оптическая плотность в лунке с нулевым стандартом не должна быть больше 0,15, в противном случае это свидетельствует о недостаточной отмывке планшета или о контаминации. В случае если величина оптической плотности, измеренной в лунке с 6-м стандартом, не превышает 0,6, это является признаком порчи реагентов.

6.3.3. Когда оптическая плотность, измеренная в лунках с исследуемыми растворами, превышает значение 2,0 или находится в районе максимальной концентрации по градуировочной характеристике, то экстракты таких образцов разбавляют и анализируют заново (учитывая фактор разбавления).

6.3.4. По результатам средних значений оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации в них глиадина (мкг/дм^3), строят градуировочную характеристику в полулогарифмической системе координат.

6.3.5. По двум параллельным определениям рассчитывают среднее арифметическое значение оптической плотности в исследуемом образце и считывают по градуировочной характеристике концентрацию глиадина (мкг/дм^3).

6.3.6. Для того чтобы вычислить концентрацию глиадина в исследуемой исходной пробе (мкг/кг) (ppb), величину концентрации глиади-

на, полученную по градуировочной характеристике, умножают на соответствующий фактор разбавления.

При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления равен 500.

В глютене содержится около 50 % глиадина. При необходимости оценки содержания глютена в пробе (мкг/кг) результат определения глиадина умножают на 2.

6.3.7. Для проверки правильности анализа рекомендуется использовать контрольные образцы: отрицательный контроль – не содержит глиадина, и два положительных контроля с разным, сертифицированным содержанием глиадина.

Подготовка стандартных образцов для анализа:

• в пробирке взвешивают (1 ± 0,0001) г стандартного образца и добавляют 10 см^3 60 %-го раствора этанола;

• пробирки хорошо закрывают крышками и тщательно перемешивают на лабораторном шейкере типа Вортекс в течение 30 с;

• на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax для пробирок в течение 10 мин при комнатной температуре встряхивают пробирки, переворачивая их;

• центрифугируют при ≥ 2 500 g в течение 10 мин при комнатной температуре;

• надосадок переносят в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Эти пробирки могут храниться в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте.

Подготовленные стандартные образцы сначала разбавляют разбавляющим буферным раствором (п. 5.4) в 50 раз, затем вносят в планшет вместе со стандартными и исследуемыми растворами (п. 6.2.2.2).

7. Проведение анализа при использовании тест-систем, подобных RIDASCREEN® FAST Gliadin или аналогов

7.1. Подготовка проб к анализу

В зависимости от типа пробы рекомендуются различные процедуры пробоподготовки:

7.1.1. Продукты, не подвергавшиеся термообработке при температуре > 90 °С

Жидкие образцы. Смешивают в пробирке 1 см^3 пробы и 9 см^3 60 %-го раствора этанола. При исследовании продуктов переработки сои в пробирку дополнительно добавляют (1 ± 0,0001) г обезжиренного сухого

молока. Рекомендуется проверять сухое молоко на отсутствие примеси глютена с помощью тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin (п. 9) или аналога перед его внесением в образец или непосредственно во время опыта в качестве дополнительного образца. При положительных результатах сухое молоко следует заменить и повторить опыт.

Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс и в течение 10 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax, переворачивая их.

Мягкие образцы (кремы, соусы, мука, порошки) Смешивают в пробирке (1 ± 0,0001) г представительной пробы и 10 см^3 60 %-го раствора этанола. При исследовании продуктов переработки сои в пробирку дополнительно добавляют (1 ± 0,0001) г обезжиренного сухого молока. Рекомендуется проверять сухое молоко на отсутствие примеси глютена с помощью тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin (п. 9) или аналога перед его внесением в образец или непосредственно во время опыта в качестве дополнительного образца. При положительных результатах сухое молоко следует заменить и повторить опыт.

Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс и в течение 10 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax, переворачивая их.

Твердые образцы. Берут (5 ± 0,01) г твердого образца и тщательно гомогенизируют с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или ступки фарфоровой с пестиком до порошкообразного состояния. Смешивают в пробирке (1 ± 0,0001) г измельченной пробы и 10 см^3 60 %-го раствора этанола. Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс и в течение 10 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax, переворачивая их.

Образцы с неоднородным распределением глютена (например, сосиски и другие мясные продукты). В образцах этого типа глиадин может быть распределен неравномерно, поэтому для повышения надежности результатов анализа увеличивают навеску исследуемой пробы. (20 ± 0,01) г представительной пробы помещают в коническую колбу на 200 см^3 и добавляют 200 см^3 60 %-го раствора этанола. Энергично встряхивают колбу в течение 30 с и в течение 10 мин перемешивают, переворачивая колбу вверх-вниз. Отбирают 10 см^3 в чистую пробирку.

Приготовленные пробы жидких, мягких, твердых образцов и образцов с неоднородным распределением глютена центрифугируют при ≥ 2 500 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем переносят верхний слой в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Экс-

тракты хранят в плотно закрытых пробирках в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте.

Далее следуют п. 7.2.1.

7.1.2. Продукты с высоким содержанием таннинов и полифенолов (например, какао, шоколад, чай, кофе, чечевица и др.), не подвергавшиеся термообработке

Берут (2 ± 0,01) г твердого образца и тщательно гомогенизируют с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или ступки фарфоровой с пестиком до порошкообразного состояния. Взвешивают в пробирке (1 ± 0,0001) г хорошо измельченной пробы и добавляют 10 $см^3$ раствора рыбного желатина (п. 5.4). Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс и в течение 10 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax, переворачивая их.

Приготовленные пробы центрифугируют при ≥ 3 000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем переносят верхний слой в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Экстракты можно хранить в плотно закрытых пробирках в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте.

Далее следуют п. 7.2.1.

7.1.3. Продукты, подвергавшиеся термообработке при температуре > 90 °С

Пробоподготовку образцов данного типа проводят по п. 6.1, далее следуют п. 7.2.1.

7.2. Проведение анализа

Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета.

На всех стадиях инкубации следует избегать воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет крышкой.

7.2.1. Приготовление рабочих растворов исследуемых образцов

Экстракты из проб продуктов, полученные по п. 7.1.1 и 7.1.2, разбавляют готовым разбавляющим буферным раствором (п. 5.4) в 50 раз, а полученные по п. 7.1.3 – в 12,5 раз.

Для анализа используют 100 $мм^3$ рабочего раствора исследуемых образцов на лунку планшета.

7.2.2. Проведение испытаний

7.2.2.1. В рамку планшета вставляют лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов, записывают в таблицу.

7.2.2.2. С помощью дозатора пипеточного добавляют по 0,10 $см^3$ стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок и оставляют планшет на инкубацию в течение 10 мин при комнатной температуре.

7.2.2.3. По окончании сорбции проводят промывку планшета. Для этого удаляют жидкость из лунок встряхиванием перевернутого планшета и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Далее наполняют лунки 0,25 $см^3$ моющего буферного раствора (п. 5.4) и снова выливают жидкость. Выбивают капельки жидкости как описано выше и повторяют процедуру отмывки лунок моющим буферным раствором еще 2 раза.

7.2.2.4. С помощью дозатора пипеточного добавляют в каждую лунку по 100 $мм^3$ готового раствора коньюгата (п. 5.4). Осторожно перемешивают вручную и оставляют на инкубацию в течение 10 мин при комнатной температуре.

Далее вновь проводят промывку планшета по п. 7.2.2.3.

7.2.2.5. С помощью дозатора пипеточного добавляют по 0,05 $см^3$ субстрата и по 0,05 $см^3$ хромогена в каждую лунку. Осторожно перемешивают вручную и инкубируют в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре.

7.2.2.6. С помощью дозатора пипеточного добавляют в каждую лунку по 0,10 $см^3$ стоп-реагента и осторожно перемешивают вручную.

7.2.2.7. В течение 30 мин после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке.

7.3. Обработка результатов анализа

7.3.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на вертикальном фотометре при длине волны 450 нм против «бланка» или нулевого считывания по воздуху.

Результаты записей оптической плотности переносят в таблицу и располагают в соответствии с номерами образцов.

7.3.2. Оптическая плотность в лунке с нулевым стандартом не должна быть больше 0,15, в противном случае это свидетельствует о недостаточной отмывке планшета или о контаминации. В случае если

величина оптической плотности, измеренной в лунке с 5-м стандартом, не превышает 0,6, это является признаком порчи реагентов.

7.3.3. Когда оптическая плотность, измеренная в лунках с исследуемыми растворами, превышает значение 2,0 или находится в районе максимальной концентрации по градуировочной характеристике, то экстракты таких образцов разбавляют и анализируют заново (учитывая фактор разбавления).

7.3.4. По результатам средних значений оптической плотности, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации глиадина (мкг/дм^3) строится градуировочная характеристика в полулогарифмической системе координат.

7.3.5. По двум параллельным определениям рассчитывают среднее арифметическое значение оптической плотности в исследуемом образце и считывают по градуировочной характеристике концентрацию глиадина (мкг/дм^3).

7.3.6. Для того чтобы вычислить концентрацию глиадина в исследуемой исходной пробе (мг/кг) (ppm), величину концентрации глиадина, полученную по градуировочной характеристике, умножают на соответствующий фактор разбавления.

При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления равен 500.

В глютене содержится около 50 % глиадина. При необходимости оценки содержания глютена (мг/кг) в пробе результат определения глиадина умножают на 2.

7.3.7. Для проверки правильности анализа рекомендуется использовать контрольные образцы: отрицательный контроль – не содержит глиадина, и два положительных контроля с разным, сертифицированным содержанием глиадина.

Подготовка стандартных образцов для анализа:

• в пробирке взвешивают (1 ± 0,0001) г стандартного образца и добавляют 10 см^3 60 %-го раствора этанола;

• пробирки хорошо закрывают крышками и тщательно перемешивают на лабораторном шейкере типа Вортекс в течение 30 с;

• на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax для пробирок в течение 10 мин при комнатной температуре встряхивают пробирки, переворачивая их;

• центрифугируют при ≥ 2 500 g в течение 10 мин при комнатной температуре;

• надосадок переносят в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Эти пробирки могут храниться в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте.

Подготовленные стандартные образцы сначала разбавляют разбавляющим буферным раствором (п. 5.4) в 50 раз, затем вносят в планшет вместе со стандартными и исследуемыми растворами (п. 7.2.2.2).

8. Проведение анализа при использовании тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin competitive или аналогов

8.1. Подготовка проб к анализу

Пробы тщательно перемешивают и при необходимости (5 ± 0,01) г гомогенизируют. В пробах продуктов, где глютен может быть распределен неравномерно, для обеспечения представительности анализа гомогенизируют минимум (50 ± 0,01) г пробы.

8.1.1. Экстракцию глиадина проводят раствором этанола:

Твердые пробы (например, крахмал и крахмальный сироп): в пробирке смешивают (1 ± 0,0001) г гомогенизированной представительной пробы и 10 см^3 60 %-го раствора этанола (п. 5.4).

Жидкие пробы (например, соевый соус): в пробирке смешивают 1 см^3 пробы и 9 см^3 60 %-го раствора этанола (п. 5.4).

Пиво: в пробирке смешивают 1 см^3 пива и 9 см^3 рыбного желатина (п. 5.4).

8.1.2. Пробирки хорошо закрывают крышками и встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс и в течение 10 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе) типа Multi reax, переворачивая их.

8.1.3. Центрифугируют при ≥ 2 500 g в течение 10 мин при комнатной температуре.

8.1.4. Надосадок переносят в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Экстракты можно хранить в плотно закрытых пробирках в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте. Далее следуют п. 8.2.1.

8.2. Проведение анализа

Воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа.

В процессе выполнения анализа не допускают высыхания лунок планшета.

На всех стадиях инкубации следует избегать воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет крышкой.

8.2.1. Приготовление рабочих растворов исследуемых образцов

Экстракты из проб продуктов, полученные по п. 8.1.1, разбавляют готовым разбавляющим буфером (п. 5.4) в 50 раз.

Для анализа используется 0,05 $см^3$ разбавленного раствора исследуемых образцов на лунку планшета

8.2.2. Проведение испытаний

8.2.2.1. В рамку планшета необходимо вставить лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений в двух повторностях. Координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов, записывают в таблицу.

8.2.2.2. С помощью дозатора пипеточного добавляют по 0.05 $см^3$ стандартных и исследуемых растворов в соответствующие пары лунок.

8.2.2.3. С помощью дозатора пипеточного добавляют в каждую лунку по 0,05 $см^3$ готового раствора коньюгата (п. 5.4). Осторожно перемешивают вручную и оставляют на инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре.

8.2.2.4. По окончании сорбции проводят промывку планшета. Для этого удаляют жидкость из лунок встряхиванием перевернутого планшета и тщательно выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Далее наполняют лунки 0,25 $см^3$ моющего буферного раствора (п. 5.4) и снова выливают жидкость. Выбивают капельки жидкости как описано выше и повторяют процедуру отмывки лунок моющим буферным раствором еще 2 раза.

8.2.2.5. С помощью дозатора пипеточного добавляют по 0,10 $см^3$ субстрата (хромогена) в каждую лунку. Осторожно перемешивают вручную и инкубируют в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре.

8.2.2.6. С помощью дозатора пипеточного добавляют в каждую лунку по 0,10 $см^3$ стоп-реагента и осторожно перемешивают вручную.

8.2.2.7. В течение 10 мин после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке.

8.3. Обработка результатов анализа

8.3.1. Инструментальный учет реакции проводят путем измерения оптической плотности на вертикальном фотометре при длине волны 450 нм против «бланка» или нулевого считывания по воздуху.

Результаты записей оптической плотности переносят в таблицу и располагают в соответствии с номерами образцов.

Если величина оптической плотности, измеренной в лунке с 1-м стандартом ниже 0,8, это является признаком порчи реагентов.

8.3.2. Вычисляют средние значения оптической плотности стандартных и исследуемых растворов.

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

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

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

$ОП_i$ – средние значения оптической плотности стандартных и исследуемых растворов;

$ОП_0$ – среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

8.3.3. По величинам значений оптической плотности, выраженным в процентах от оптической плотности нулевого стандарта, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации глиадина (мкг/см^3), строят градуировочную характеристику в полулогарифмической системе координат.

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

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

8.3.5. Концентрацию глиадина в исследуемых растворах (мкг/см^3) считывают по градуировочной характеристике соответственно значениям оптической плотности, которые вычислены по формуле (1) (п. 8.3.2.).

8.3.6. Для того чтобы вычислить концентрацию глиадина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации, полученную по градуировочной характеристике, умножают на соответствующий фактор разбавления.

При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления равен 500. При от-

клонении от методики следует использовать соответствующий фактор разбавления.

8.3.7. В глютене содержится около 50 % глиадина. При необходимости оценки содержания глютена (мг/кг) в пробе результат определения глиадина умножают на 2.

Однако, следует иметь в виду, что глубина гидролиза глиадина определяется спецификой пищевого производства, поэтому в разных образцах пищевых продуктов могут содержаться разное количество коротких и/или длинных фрагментов глиадина, особенно это заметно при исследовании крахмалов (чем выше глубина отмывки крахмала, тем больше в нём глиадина, в этом случае коэффициент пересчета будет более 2, и соответственно концентрация глютена будет выше).

9. Проведение анализа при использовании тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin или с аналогов

9.1. Подготовка к анализу

В зависимости от типа исследуемых материалов рекомендуются различные процедуры подготовки к анализу.

9.1.1. Сырье и пищевые продукты, не подвергавшиеся термической обработке

Жидкие образцы. Смешивают в пробирке 1 $см^3$ пробы и 9 $см^3$ 60 %-го раствора этанола. При исследовании соевого молока в пробирку дополнительно добавляют (1 ± 0,0001) г обезжиренного сухого молока. Рекомендуется проверять сухое молоко на отсутствие примеси глютена с помощью тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin (п. 9) или аналогов перед его внесением в образец или непосредственно во время опыта в качестве дополнительного образца. При положительных результатах сухое молоко следует заменить и повторить опыт. Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс.

Мягкие образцы (кремы, соусы, мука, порошки) Смешивают в пробирке (1 ± 0,0001) г представительной пробы и 10 $см^3$ 60 %-го раствора этанола. При исследовании продуктов, в состав которых входит соевое молоко, в пробирку дополнительно добавляют (1 ± 0,0001) г обезжиренного сухого молока. Рекомендуется проверять сухое молоко на отсутствие примеси глютена с помощью тест-полосок, подобных RIDA® QUICK Gliadin (п. 9) или аналогов перед его внесением в образец или непосредственно во время опыта в качестве дополнительного образца. При положительных результатах сухое молоко следует заменить и по-

вторить опыт. Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс.

Твердые образцы. Берут (5 ± 0,01) г твердого образца и тщательно гомогенизируют с помощью лабораторной мельницы, гомогенизатора или ступки фарфоровой с пестиком до порошкообразного состояния. Смешивают в пробирке (1 ± 0,0001) г гомогенизированной пробы и 10 см^3 60 %-го раствора этанола. Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс.

Образцы с неоднородным распределением глютена (например, сосиски и другие мясные продукты). В образцах этого типа глютен или глиадин может быть распределен неравномерно, поэтому для повышения надежности результатов анализа рекомендуется увеличить навеску исследуемой пробы. (20 ± 0,01) г представительной пробы помещают в коническую колбу на 200 см^3 и добавляют 200 см^3 60 %-го раствора этанола. Энергично встряхивают колбу в течение 30 с и в течение 10 мин перемешивают, переворачивая колбу вверх-вниз. Отбирают 10 см^3 в чистую пробирку.

Продукты, содержащие таннин и полифенолы (например, какао, шоколад, чай, кофе, чечевица и др.). Берут (2 ± 0,01) г твердого образца и тщательно гомогенизируют лабораторной мельницей, гомогенизатором или ступкой фарфоровой с пестиком до порошкообразного состояния. Взвешивают в стеклянной пробирке с завинчивающейся пробкой (1 ± 0,0001) г хорошо измельченной пробы и добавляют 10 см^3 раствора рыбного желатина (п. 5.4). Пробирки встряхивают ≥ 30 с на лабораторном шейкере типа Вортекс.

Приготовленные пробы образцов центрифугируют при ≥ 2 500 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем переносят верхний слой в чистую пробирку с завинчивающейся крышкой. Эти пробирки можно хранить в плотно закрытых пробирках в течение 4 недель при комнатной температуре в темноте.

9.1.2. Исследование чистоты поверхности

Нижней частью тест-полоски протирают исследуемую поверхность размером примерно 10 × 10 см.

Далее следуют п. 9.2, исключая шаг 3.

9.2. Проведение анализа

9.2.1. Проведение испытаний

9.2.1.1. В штатив устанавливают пробирки и подписывают в соответствии с исследуемыми пробами.

9.2.1.2. С помощью разовой пипетки в каждую пробирку вносят по 0,500 $см^3$ готового буферного раствора (п. 5.4).

9.2.1.3. Затем вносят по 0,05 $см^3$ экстрактов (п. 9.1.1) в соответствующие пробирки и осторожно перемешивают.

9.2.1.4. В каждую пробирку вертикально опускают тест-полоски стрелками вниз, не ниже ограничивающей отметки.

9.2.1.5. Тест-полоски извлекают из пробирок через 5 мин и считывают результаты анализа.

9.3. Интерпретация результатов анализа

9.3.1. *Положительный результат* – появление на мембране двух окрашенных полос (контрольная – полоса голубого цвета, аналитическая – красного). Интенсивность окрашивания красной полосы зависит от содержания глиадина в пробе. Положительный результат указывает, что в пробе сырья или пищевых продуктов содержится более 2,5 мг/кг глиадина (5 мг/кг глютена), а поверхность загрязнена глиадином (более 0,5 мкг глиадина на 100 $см^2$).

Отрицательные результаты – появление на мембране только одной контрольной полосы голубого цвета.

Отсутствие аналитической полосы при анализе сырья и пищевых продуктов свидетельствует о том, что в исследуемой пробе сырья или пищевых продуктов содержится менее чем 2,5 мг/кг глиадина (менее 5 мг/кг глютена), а поверхность не загрязнена глиадином (менее 0,5 мкг глиадина на 100 $см^2$).

Результат считается *недействительным*, если на мембране отсутствует контрольная полоса голубого цвета.

9.3.2. Для документирования результатов анализа отрезают верхнюю часть полоски с надписью «Gluten», при этом реакции на мембране будут остановлены.

9.3.3. Для количественного определения используют наборы, подобные RIDASCREEN® Gliadin и RIDASCREEN® FAST Gliadin или с аналогичными характеристиками.

10. Проверка приемлемости результатов параллельных измерений

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое из двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости:

$$|C_1 - C_2| \le r_{сход.}, \text{ где} \qquad (2)$$

C_1 и C_2 – результаты двух параллельных определений концентрации глиадина;

$r_{отн.}$ – предел повторяемости, приведенный в табл. 2.

При невыполнении условия (2) выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

11. Оформление результатов измерений

Результат вычислений округляют до первого значащего знака после запятой.

Результат анализа представляют в виде (при вероятности $P = 0,95$):

• для тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin, RIDASCREEN® FAST Gliadin: ($C_{ср.} \pm \Delta$), мг глютена/кг (мг глютена/дм^3);

• для тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin competitive: ($C_{ср.} \pm \Delta$), мг глютена/кг (мг глютена/см^3), где

$C_{ср.}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг (мг/дм^3) глютена;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг (мг/дм^3) глютена (табл. 2, показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций).

Для тест-систем, подобных RIDA® QUICK GLIADIN: при положительном результате анализа указывают «содержание глютена в пробе более 5 мг/кг».

В случае если содержание глютена в пробе меньше нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

• для тест-систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin – «содержание глютена в пробе менее 3 мг/кг (мг/дм^3)»;

• для тест-систем, подобных RIDASCREEN® FAST Gliadin – «содержание глютена в пробе менее 4 мг/кг (мг/дм^3)»;

• для систем, подобных RIDASCREEN® Gliadin competitive – «содержание глютена в пробе менее 5 мг/кг (мг/см^3)»;

• для тест-полосок, подобных RIDA®QUICK Gliadin – «содержание глютена в пробе менее 5 мг/кг».

gost.e-ecolog.ru