Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение изолята соевого белка в составе мясных продуктов

Методические указания
МУК 4.1.2881—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

Определение изолята соевого белка в составе мясных продуктов

Методические указания
МУК 4.1.2881—11

ББК 51.23
О60

О **Определение** изолята соевого белка в составе мясных продуктов: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—31 с.

ISBN 978—5—7508—1009—3

1. Разработаны НИИ питания РАМН (В. А. Тутельян, В. К. Мазо, С. Н. Зорин, О. И. Козлова); ГНУ ВНИИМП им. В. М. Горбатова Россельхозакадемии (А. Б. Лисицын, Ю. К. Юшина, А. Н. Иванкин, О. Е. Усанова); ООО «Стайлаб» (А. В. Галкин).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по 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 27 июня 2011 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1009—3

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

Содержание

1. Область применения 4
2. Общие положения 4
3. Отбор и хранение анализируемых проб образцов 5
4. Принцип метода 5
5. Средства измерений, материалы, реактивы 6
6. Требования техники безопасности при проведении испытаний 8
7. Требования к квалификации операторов 8
8. Условия измерений 8
9. Определение ИБС в колбасных изделиях 9
9.1. Подготовка проб 9
9.2. Подготовка стандартов ИБС 10
9.3. Подготовка полистирольной планшеты – сенсибилизация планшеты (иммобилизация антигена, белка сои, на поверхности лунок планшета) 10
9.4. Подготовка реагентов для анализа 11
9.5. Процедура анализа 12
9.6. Обработка результатов 14
9.7. Пример расчета содержания ИБС в анализируемом образце (колбасном изделии) 17
10. Определение соевого белка в мясных консервах 19
10.1. Подготовка проб 19
10.2. Подготовка стандартных образцов 19
10.3. Подготовка полистирольной планшеты (сенсибилизация планшеты) 20
10.4. Подготовка реагентов для анализа 20
10.5. Процедура анализа 20
10.6. Обработка результатов 22
10.7. Пример расчета содержания ИБС в анализируемом образце (мясных консервах) 26
11. Оценка приемлемости результатов параллельных определений 29
12. Оформление результатов измерений 30
13. Контроль качества результатов измерений 30
13.1. Контроль промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности 30
13.2. Контроль правильности результатов анализа 30

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение изолята соевого белка в составе мясных продуктов

Методические указания МУК 4.1.2881—11

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методы определения содержания изолята белков сои (ИБС) в колбасных изделиях, мясных консервах на основе твердофазного непрямого (конкурентного) иммуноферментного анализа.

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. Общие положения

2.1. ИБС, который добавляют в состав мясопродуктов в качестве связывающего вспомогательного вещества, является источником растительных белков.

2.2. Для определения ИБС в составе мясопродуктов был разработан метод непрямого (конкурентного) иммуноферментного анализа (далее – ИФА).

2.3. Разработанный метод позволяет определять ИБС при минимальной его концентрации 0,2 % по массе продукта.

2.4. Для целей настоящих методических указаний в документе использованы следующие сокращения:

PBS – фосфатно-солевой буфер;

ИБС – изолят белков сои;

ИФА – иммуноферментный анализ;

НЛС – нормальная лошадиная сыворотка;

НЛС-PBS – 0,5 %-й раствор НЛС в PBS.

3. Отбор и хранение анализируемых проб образцов

3.1. Отбор пищевых образцов для исследования осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТ 9792—73 «Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб»; ГОСТ 8756.0—70 «Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию».

3.2. Отобранные образцы продуктов герметично упаковывают в полиэтиленовые мешки, стеклянные банки с притертыми крышками, маркируют и нумеруют. Образцы доставляют в лабораторию для анализа сразу же после отбора проб. В случае необходимости допускается хранить образцы при температуре (4 ± 2) °С в течение времени, не превышающего срока годности пищевых продуктов или замораживать при температуре –10—12 °С и хранить не более 2 недель.

4. Принцип метода

Разработанный метод основан на конкуренции предварительно иммобилизованных на твёрдой поверхности (лунке полистирольной планшеты) антигенов и таких же антигенов, находящихся в растворе образца, за центры связывания специфичных к этим антигенам антител, вносимых в тот же раствор. В результате конкуренции количество антител, фиксируемых на твёрдой поверхности, оказывается в обратной зависимости по отношению к содержанию антигенов в растворе образца. После удаления раствора антител, связанных с определяемыми антигенами, добавляют раствор вторичных антивидовых антител, конъюгированных с пероксидазой. Вторичные антитела, оставшиеся в растворе, т. е. непрореагировавшие с антителами к соевому белку, удаляют. Затем добавляют в систему раствор хромогенного субстрата. Пероксидаза, конъюгированная со вторичными антителами, расщепляет хромогенный субстрат с образованием окрашенного продукта. При этом концентрация определяемого антигена, содержащегося в исследуемом образце, обратно пропорциональна концентрации продукта, образовавшегося в результате ферментативной реакции и регистрируемой оптической плотности

раствора при длине волны, соответствующей максимуму поглощения продукта.

5. Средства измерений, материалы, реактивы

Фотометр иммуноферментный планшетный «ЭФОС 9305» (производства «ОАО МЗ Сапфир», Россия) со светофильтром на длину волны 492 нм	ТУ 9443-001-23348869—95
Плита нагревательная «ES-H3040»	
Блендер или лабораторный гомогенизатор типа Waring 800S	
Диспергатор типа ULTRA-TURRAX T 18 basic или с аналогичными характеристиками	
Лиофильная сушка типа Martin Christ Alpha или с аналогичными характеристиками	
Анализатор потенциометрический	ГОСТ 19881—74
Центрифуга лабораторная ОПН-8 с регулируемой скоростью вращения до 8 000 об./мин	
Суховоздушный термостат ТСМ-80М	
Аппарат лабораторный для встряхивания	ТУ 64-1-2451—78
Весы аналитические лабораторные электронные с верхним пределом взвешивания 120 г 2-го класса точности ± 0,1 мг	ГОСТ 24104—88
Весы лабораторные ± 0,1 г	ГОСТ 24104—2001
Дозатор пипеточный автоматический с переменным объемом 0—0,02 $см^3$ одноканальный	ТУ 64-1-2828—81
Дозатор пипеточный автоматический с переменным объемом 0,02—0,2 $см^3$ одноканальный	
Дозаторы пипеточные автоматические с переменным объемом 0,2—1 $см^3$ одноканальный	
Дозатор пипеточный автоматический с переменным объемом 0,05—0,2 $см^3$ восьмиканальный	
Наконечники для автоматических пипеток объемом до 0,3 и до 5,0 $см^3$ однократного применения	
Колбы конические со шлифом № 14 или 29 с притертой стеклянной пробкой вместимостью 50 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Планшеты для иммуноферментного анализа однократного применения (полистирольные плоскодонные немодифицированные)	ТУ 64-2-375—86

Лабораторная химическая посуда (пробирки, мерные цилиндры, мерные колбы, стаканы, флаконы) общего назначения	ГОСТ 1770—74
Холодильник бытовой с морозильной камерой с температурой заморозки до –20 °С	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Натрий хлористый, хч*	ГОСТ 4233—77
Азид натрия (имп.), хч*	
Типа Твин-20, «Serva» (Германия) или с аналогичными характеристиками	
Калий фосфорно-кислый 1-замещенный, чда*	ГОСТ 4198—75
Калий фосфорно-кислый 2-замещенный 3-водный, чда*	ГОСТ 2493—75
Натрий двууглекислый, хч*	ГОСТ 4201—79
Натрия гидроксид, хч*	ГОСТ 4328—77
Натрий фосфорно-кислый 2-замещенный 12-водный, чда*	ГОСТ 4172—76
О-Фенилендиамин, ч*	ТУ 6-09-05-1291—84
Кислота серная, осч*	ГОСТ 4204—77
Желатин марки П-11	ГОСТ 11293—89
Антитела диагностические против IgG (H+L) кролика, меченные пероксидазой, сухие (антивидовый конъюгат) (рабочее разведение указано производителем на каждой партии препарата) подобные «Медгамал» НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН или с аналогичными характеристиками	
Кислота лимонная моногидрат, чда*	ГОСТ 3652—69
Антитела к соевому белку, концентрированные подобные «RIDA Antiserum Raninchen/rabbit gegen Soja protein /Glicinin to soyabean protein» art/.No.: R45254 (Германия) или с аналогичными характеристиками	
Сыворотка нормальная лошадиная	Рег. №92/03-300200000
Экстрагент подобный «RIDA Extraction Solution» (Германия) или с аналогичными характеристиками	
Экстрагирующий буфер подобный «RIDAS-CREEN Allergen extraction buffer» (Германия) или с аналогичными характеристиками	

Перекись водорода «медицинская» 33 % ТУ 6-02-570—75
Изолят белков сои «Sypro Hamburg» (Германия), содержание белка (83,4 ± 0,3) %

(*) Допускается применение других средств измерений, оборудования и реактивов аналогичными техническими, метрологическими и качественными характеристиками.

6. Требования техники безопасности при проведении испытаний

При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76.

Помещение, в котором проводятся измерения, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004—91, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83.

При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019—79.

Все применяемые реактивы, за исключением *о*-фенилендиамина, в используемых концентрациях не токсичны. *о*-Фенилендиамин обладает канцерогенным действием. Поэтому в случае попадания вещества на кожные или слизистые покровы следует немедленно тщательно смыть его большим количеством воды. Стоп-реагент содержит в своем составе серную кислоту. Следует избегать контакта стоп-реагента с кожей.

Необходимо провести обучение работающих безопасности труда согласно ГОСТ 12.04.004.

7. Требования к квалификации операторов

К выполнению работы допускается обученный персонал со средним специальным или высшим образованием, прошедший в установленном порядке инструктаж, имеющий навыки практической работы в области химического и биохимического анализа и освоивший метод анализа.

8. Условия измерений

Измерения осуществляют в оборудованной для химического анализа лаборатории в условиях параметров окружающей среды, обозначенных в инструкциях по эксплуатации применяемого оборудования. Температура воздуха (20 ± 5) °С, атмосферное давление 84—106 кПа, относительная влажность воздуха не более 80 %.

9. Определение ИБС в колбасных изделиях

9.1. Подготовка проб

Отбор образцов для анализа ведется в соответствии с п. 3 данного документа. Образцы, предназначенные для анализа, должны храниться в холодильнике без доступа света.

9.1.1. Подготовка реагентов для анализа

При исследовании образцов мясопродуктов для пробоподготовки необходимо приготовить следующие реагенты:

1) фосфатно-солевой буфер (PBS). Навеску (68,0 ± 0,2) г калия фосфорно-кислого 1-замещенного, взятую на лабораторных весах, переносят в мерную колбу на 500 см^3, растворяют и доводят дистиллированной водой до метки. Навеску (228 ± 0,2) г калия фосфорно-кислого 2-замещенного 3-водного, взятую на лабораторных весах, переносят в мерную колбу на 1 000 см^3, растворяют и доводят дистиллированной водой до метки. Полученные растворы смешивают под контролем потенциометрического анализатора до достижения величины pH = 7,6 ± 0,05. Навеску (180 ± 0,2) г натрия хлористого переносят в мерную колбу на 1 000 см^3, растворяют и доводят дистиллированной водой до метки. В мерную колбу на 2 000 см^3 вносят мерным цилиндром 20 см^3 смеси растворов фосфатов и 100 см^3 раствора натрия хлористого и доводят дистиллированной водой до метки;

2) раствор экстрагирующего буфера подобный «RIDASCREEN Allergen extraction buffer» (далее – ЭБ-2), или с аналогичными характеристиками, готовят непосредственно перед его использованием. ЭБ-2 разводят в дистиллированной воде в 20 раз (1 : 19), например, смешав 2,5 см^3 экстрагирующего буфера и 47,5 см^3 дистиллированной воды.

9.1.2. Приготовление проб

Пробу мясопродукта (анализируемый образец) измельчают с использованием лабораторного гомогенизатора. Далее (12,0 ± 0,1) г гомогенизированной пробы помещают в стакан диспергатора, внесят 48 см^3 PBS и проводят размельчение образца мясопродукта до однородной массы при 24 000 об./мин.

Внимание! Каждую пробу анализируют в трех параллелях, т. е. готовят три экстракта анализируемого образца.

Для получения трех экстрактов анализируемого образца берут три аликвоты по 0,25 см^3 диспергата, переносят их в три конические колбы и взвешивают на аналитических весах.

Внимание! Массу каждой аликвоты 0,25 $см^3$ (g) учитывают в дальнейших расчетах п. 9.6.3.1. Вносят в каждую колбу по 2,5 $см^3$ экстрагента подобный «RIDA Extraction Solution» (далее – ЭБ-1). Колбы закрывают крышками и помещают на нагревательную плиту при 60 °С на 90 мин (периодически встряхивая вручную). Затем в колбы вносят по 7,5 $см^3$ предварительно нагретого до 60 °С ЭБ-2 и проводят инкубацию в течение 90 мин на нагревательной плите при 60 °С (периодически встряхивая вручную).

Далее охлаждают полученные экстракты до комнатной температуры. Экстракты готовы к проведению ИФА. Полученные экстракты допускается оставлять на 16 ч при 4 °С в холодильнике или в течение 2 недель при –20 °С. Размораживают на воздухе при комнатной температуре.

9.2. Подготовка стандартов ИБС

В качестве стандарта используют аттестованный образец ИБС с содержанием белка (83,4 ± 0,3) %, типа выпускаемой компанией «Sypro Hamburg» или с аналогичными характеристиками. Навеску ИБС (50,0 ± 0,1) мг растворяют в 2,5 $см^3$ ЭБ-1 на нагревательной плите в конической колбе при закрытой крышке при 60 °С в течение 90 мин. Затем в колбу вносят 7,5 $см^3$ предварительно нагретого до 60 °С ЭБ-2 и проводя инкубацию в течение 90 мин на нагревательной плите при 60 °С.

Затем полученный раствор охлаждают до комнатной температуры и объем доводят до 100 $см^3$ 0,5 %-м водным раствором нормальной лошадиной сыворотки (НЛС). Полученный стандарт разливают по 2,0 $см^3$ в стеклянные флаконы (вместимостью 6—12 $см^3$) и после предварительного замораживания при температуре не выше –25 °С лиофильно высушивают. Условия лиофилизации являются стандартными для водных растворов белков и прописаны в инструкции по эксплуатации сушки.

9.3. Подготовка полистирольной планшеты – сенсибилизация планшеты (иммобилизация антигена, белка сои, на поверхности лунок планшета)

9.3.1. Подготовка антигена

Навеску (1,0 ± 0,05) г ИБС переносят в стеклянный флакон (вместимостью 15—30 $см^3$) и добавляют 10,0 $см^3$ PBS. Полученную смесь помещают на 3 ч на лабораторный встряхиватель при комнатной температуре. Затем взвесь центрифугируют в течение 15 мин при 3 000 об./мин. Отбирают супернатант.

9.3.2. Подготовка буфера для сенсибилизации планшеты (0,1 М бикарбонатный буфер)

Навеску (4,00 ± 0,05) г натрия гидроксида переносят в мерную колбу на 100 см^3 (навеску готовят на лабораторных весах), растворяют и доводят дистиллированной водой до метки. Навеску (8,40 ± 0,05) г натрия двууглекислого помещают в стакан на 1 000 см^3, растворяют в 800—900 см^3 дистиллированной воды на магнитной мешалке. Добавляют раствор натрия гидроксида при перемешивании под контролем анализатора потенциометрического до достижения pH 9,7 ± 0,1. Смесь количественно переносят в мерную колбу на 1 000 см^3 и доводят дистиллированной водой до метки. Полученный раствор хранится при 4 °С в темноте в течение 1 месяца.

9.3.3. Сенсибилизация планшеты

Супернатант, полученный в п. 9.3.1, разводят 0,1 М бикарбонатным буфером в 100 раз (обозначается далее как сенсибилизирующий раствор), например, смешав 0,15 см^3 супернатанта с 15 см^3 0,1 М бикарбонатного буфера. В лунки планшета вносят по 0,1 см^3 сенсибилизирующего раствора, планшету закрывают крышкой и помещают на 16 ч в холодильник при 4 °С.

9.4. Подготовка реагентов для анализа

9.4.1. Подготовка фосфатного моющего буферного раствора (0,1 %-й раствор Твина-20 в PBS)

В мерную колбу на 2 000 см^3 вносят 2 см^3 Твина-20 и доводят PBS до метки. Полученный буфер хранится 48 ч в холодильнике при 4 °С.

9.4.2. Подготовка раствора желатина (1 %-й раствор желатина в PBS)

Смешивают (0,20 ± 0,01) г желатина с 20 см^3 PBS, оставляют на 16 ч в холодильнике, после чего нагревают при 37 °С на водяной бане до полного растворения.

9.4.3. Подготовка раствора нормальной лошадиной сыворотки в PBS (НЛС-PBS)

Смешивают 100 см^3 PBS с 0,5 см^3 НЛС.

9.4.3. Подготовка растворов антител к соевому белку

Раствор антител к соевому белку готовят в разведениях 1/2 000 и 1/4 000 в НЛС-PBS. Антитела вносятся в предварительно отмеренный мерным цилиндром объем НЛС-PBS с использованием пипеточного дозатора переменного объема.

9.4.4. Подготовка раствора конъюгата

Раствор конъюгата готовят в разведении, указанном изготовителем на каждой партии сухого препарата, в НЛС-PBS.

9.4.5. Подготовка субстратного буфера (0,1 М цитратный буфер)

В стакан на 1 000 см^3 вносят навески (26,3 ± 0,2) г натрия фосфорно-кислого 2-замещенного 12-водного и 5,6 г лимонной кислоты моногидрата и растворяют в 800—900 см^3 дистиллированной воды на магнитной мешалке. Количественно переносят в мерную колбу на 1 000 см^3, доводят до метки дистиллированной водой и измеряют pH на анализаторе потенциометрическом, значение которого должно составлять 6,0 ± 0,05.

9.4.6. Подготовка раствора субстрата (готовят непосредственно перед употреблением)

Навеску (21,0 ± 0,5) мг орто-фенилендиамина, взятую на аналитических весах (за 30 мин до проведения реакции), вносят в предварительно нагретую (до 40—50 °С) емкость с 40 см^3 субстратного буфера и выдерживают в темноте в течение 30 мин (в суховоздушном термостате при 37 °С). Непосредственно перед внесением в лунки планшеты в раствор субстрата добавляют 0,15 см^3 16 % перекиси водорода.

9.4.7. Подготовка стоп-реагента (0,5 Н раствор серной кислоты)

В мерную колбу на 1 000 см^3 вносят 900—950 см^3 дистиллированной воды и отмеряют цилиндром 28 см^3 серной кислоты. Раствор перемешивают, охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до метки.

9.5. Процедура анализа

9.5.1. Готовят стандартный раствор ИБС путем количественного перенесения лиофилизованного стандарта в мерный цилиндр и доведения конечного объема до 20 см^3 НЛС-PBS. После использования остающийся раствор стандарта следует замораживать при температуре –20 °С. Данный стандарт пригоден к повторному использованию после оттаивания (допускается пятикратное замораживание-оттаивание). В замороженном состоянии может храниться в течение 2 месяцев.

9.5.2. Готовят исходные разведения исследуемых образцов путем смешивания в отдельном флаконе 0,8 см^3 НЛС-PBS и 0,2 см^3 экстракта мясопродукта.

9.5.3. Выливают сенсибилизирующий раствор из лунок, перевернув планшет, и выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем

энергичного троекратного постукивания планшета по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполняют лунки 0,2 см^3 раствора фосфатного моющего буфера и снова удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок раствором фосфатного моющего буфера еще 1 раз.

9.5.4. Добавляют в каждую лунку по 0,2 см^3 раствора желатина и инкубируют 30 мин при комнатной температуре.

9.5.5. Выливают жидкость из лунок, перевернув планшет, и выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания планшета по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполняют лунки 0,2 см^3 раствора фосфатного моющего буфера и снова удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок раствором фосфатного моющего буфера еще 2 раза.

9.5.6. Добавляют в лунки A1-B1 планшета по 0,1 см^3 стандартного раствора ИБС (далее – Ст. ИБС). Добавляют в лунки C1-D1 по 0,1 см^3 исходного разведения первого экстракта из анализируемого образца (П1). Добавляют в лунки E1-F1 по 0,1 см^3 исходного разведения второго экстракта из анализируемого образца (П2). Добавляют в лунки G1-H1 по 0,1 см^3 исходного разведения третьего экстракта из анализируемого образца (П3).

Таблица 1

Разметка планшеты при определении ИБС в колбасных изделиях

	Раститоровка										11	12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A	Ст. ИБС	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
B	Ст. ИБС	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
C	П1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
D	П1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
E	П2	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
F	П2	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
G	П3	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
H	П3	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС

- Ст. ИБС – первое разведение стандартного раствора ИБС;
- П1, П2, П3 – параллели исходных разведений экстрактов из анализируемого колбасного изделия;
- Б(0) – столбец, соответствующий нулевому связыванию коньюгата;
- НСС – неспецифическая сорбция (ряд без внесения антител).

9.5.7. Добавляют в лунки А12-Н12 по 0,1 см^3 НЛС-PBS.

9.5.8. Добавляют в лунки А2-Н11 по 0,1 см^3 кроличьей антисыворотки против соевого белка в разведении 1 : 4 000 в НЛС-PBS.

9.5.9. Добавляют немедленно после этого в лунки А1-Н1 по 0,1 см^3 антисыворотки в разведении 1 : 2 000 в PBS-НЛС и титруют ряды 1—10 в серии двоичных разведений с помощью 8-канальной пипетки с установленным объемом 0,1 см^3.

9.5.10. Планшет инкубируют на встряхивателе 2 ч при комнатной температуре, после чего выливают жидкость из лунок, перевернув планшет, и выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания планшета по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполняют лунки 0,2 см^3 раствора фосфатного моющего буфера и снова удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок раствором фосфатного моющего буфера еще 3 раза.

9.5.11. Добавляют в каждую лунку по 0,1 см^3 раствора конъюгата. Оставляют на инкубацию в течение 90 мин при комнатной температуре.

9.5.12. Выливают жидкость из лунок, перевернув планшет, и выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания планшета по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполняют лунки 0,2 см^3 раствора фосфатного моющего буфера и снова удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок раствором фосфатного моющего буфера еще 4 раза.

9.5.13. Добавляют в каждую лунку по 0,1 см^3 раствора субстрата. Оставить инкубировать на 20 мин при 37 °С в воздушном термостате.

9.5.14. Добавляют в каждую лунку по 0,1 см^3 стоп-реагента. В течение не более 60 мин после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 492 нм на планшетном фотометре.

9.6. Обработка результатов

Расчеты производятся с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Среднее значение оптических плотностей растворов в лунках ряда А12—Н12 (НССср) вычитается из значений всех оптических плотностей растворов в остальных лунках (с использованием либо функции автоматического вычета фона прибора «Эфос9305» либо вручную).

9.6.1. Построение калибровочной кривой стандартного раствора ИБС

Рассчитывают % связывания конъюгата для каждого разведения стандартного раствора ИБС по формуле ($J(n)$ (%)):

$$J(n)\ (\%) = 100 \cdot \frac{Б_0(n) - Бп}{Б_0(n)}, \text{ где} \qquad (1)$$

$Б_0(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для нулевого связывания;

$Бп$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для каждого разведения стандартного раствора ИБС.

Строят калибровочную кривую стандартного раствора ИБС в координатах: ось абсцисс – % связывания конъюгата (J (%)), ось ординат – десятичный логарифм концентрации стандартного раствора ИБС (мкг/мл) ($Lg\ C_{(мкг/мл)}$).

9.6.2. Расчет концентрации стандартного раствора ИБС, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата

9.6.2.1. По калибровочной кривой стандартного раствора ИБС методом линейной интерполяции рассчитывают логарифм концентрации стандартного раствора ИБС, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата, (Lg (ИБС, 50 %):

$$Lg\ (\text{ИБС, 50 \%}) = Lg\ C_{1cm} + (50 - J_{1cm}) \cdot \frac{Lg\ C_{2cm} - Lg\ C_{1cm}}{J_{2cm} - J_{1cm}}, \text{ где} \qquad (2)$$

$Lg\ C_{1cm}$ – десятичный логарифм концентрации стандартного раствора ИБС, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается более 50 % конъюгата;

$Lg\ C_{2cm}$ – десятичный логарифм концентрации стандартного раствора ИБС, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается менее 50 % конъюгата;

J_{1cm} – % связывания конъюгата, соответствующий $Lg\ C_{1cm}$;

J_{2cm} – % связывания конъюгата, соответствующий $Lg\ C_{2cm}$.

9.6.2.2. Рассчитывают концентрацию стандартного раствора ИБС ($C_{ИБС\ 50\%}$ (мкг/мл), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата, по формуле:

$$C_{ИБС\ 50\ \%} = 10^{Lg\ (\text{ИБС, 50\%})} \qquad (3)$$

9.6.3. Расчет концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата

9.6.3.1. Рассчитывают концентрацию раствора исследуемого образца, соответствующую первому разведению (ряд 1 полистирольной планшеты) по формуле:

$$C\ (\text{мкг/мл}) = 1\ 000 \cdot \frac{g}{250}, \text{ где} \qquad (4)$$

C (мкг/мл) – концентрация раствора исследуемого образца в первом разведении;

g – масса 0,25 см^3 диспергата, мг (п. 9.1.2 «Приготовление проб»).

9.6.3.2. Рассчитывают % связывания конъюгата для каждого разведения раствора анализируемого образца по формуле ($J(n)$ (%)):

$$J(n)\ (\%) = 100 \cdot \frac{Б_0(n) - Бn}{Б_0(n)}, \text{ где} \qquad (5)$$

$Б_0(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для нулевого связывания;

$Б(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для каждого разведения раствора анализируемого образца.

Далее строят кривую растительровки двоичных разведений раствора исследуемого образца в координатах: ось абсцисс – % связывания конъюгата (J (%), ось ординат – десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца ($Lg\ C_{(\text{мкг/мл})}$).

9.6.3.3. По кривой растительровки двоичных разведений раствора исследуемого образца методом линейной интерполяции рассчитывают логарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующий 50 %-му связыванию конъюгата (Lg ($П$, 50 %):

$$Lg\ (П, 50\%) = Lg\ C_{1П} + (50 - J_{1П}) \cdot \frac{Lg\ C_{2П} - Lg\ C_{1П}}{J_{2П} - J_{1П}}, \text{ где} \qquad (6)$$

$Lg\ C_{2П}$ – десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается менее 50 % конъюгата;

$Lg\ C_{1П}$ – десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается более 50 % конъюгата;

$J_{2П}$ – % связывания метки, соответствующий $Lg\ C_{2П}$;

$J_{1П}$ – % связывания метки, соответствующий $Lg\ C_{1П}$.

9.6.3.4. Концентрацию раствора исследуемого образца, соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата, рассчитывают по формуле:

$$C_{П\ 50\%} = 10^{Lg\ (П,\ 50\ \%)} \qquad (7)$$

9.6.4. Расчет содержания ИБС в анализируемом образце колбасного изделия

Рассчитывают содержание ИБС в исследуемом образце (г на 100 г колбасного изделия) по формуле:

$$\text{ИБС (г/100 г)} = 100 \cdot \frac{C_{\text{ИБС 50\%}}}{C_{\text{П 50\%}}} \qquad (8)$$

9.7. Пример расчета содержания ИБС в анализируемом образце (колбасном изделии)

По калибровочной кривой стандартного раствора ИБС (содержание белка в стандарте ИБС (83,8 ± 0,3) %) определяют концентрацию стандартного раствора ИБС и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению (C_{1cm} и $Lg\ C_{1cm}$), при которых связывается более 50 % конъюгата (J_{1cm}):

$J_{1cm} = 53{,}5$ %;

$C_{1cm} = 1{,}56$ мкг/мл;

$Lg\ C_{1cm} = 0{,}194$.

Далее аналогичным образом определяют концентрацию стандартного раствора ИБС и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению (C_{2cm} и $Lg\ C_{2cm}$), при которых связывается менее 50 % конъюгата (J_{2cm}):

$J_{2cm} = 39{,}2$ %;

$C_{2cm} = 0{,}78$ мкг/мл;

$Lg\ C_{2cm} = -0{,}107$.

По формуле (2) рассчитывают десятичный логарифм концентрации стандартного раствора ИБС, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата (Lg (ИБС, 50 %):

$$Lg\ (\text{ИБС, } 50) = 0{,}194 + (50 - 53{,}5) \cdot \frac{(-0{,}107 - 0{,}194)}{(39{,}2 - 53{,}5)} = 0{,}121$$

По формуле (3) рассчитывают концентрацию стандартного раствора ИБС ($C_{ИБС\ 50\%}$ (мкг/мл), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата:

$$C_{ИБС\ 50\%} = 10^{0{,}121} = 1{,}32 \text{ мкг/мл}$$

По калибровочной кривой растворов двоичных разведений раствора исследуемого образца определяют концентрацию раствора исследуемого образца и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению ($C_{1П}$ и $Lg\ C_{1П}$), при которых связывается более 50 % конъюгата ($J_{1П}$):

$J_{1П}$ = 51,3 %;

$C_{1П}$ = 137,5 мкг/мл;

$Lg\ C_{1П}$ = 2,138.

Далее аналогичным образом определяют концентрацию раствора исследуемого образца и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению ($C_{2П}$ и $Lg\ C_{2П}$), при которых связывается менее 50 % конъюгата ($J_{2П}$):

$J_{2П}$ = 39,9 %;

$C_{2П}$ = 68,75 мкг/мл;

$Lg\ C_{2П}$ = 1,837.

По формуле (6) рассчитывают десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата (Lg (П, 50 %):

$$Lg\ (П,\ 50\ \%) = 2{,}138 + (50 - 51{,}53) \cdot \frac{(1{,}837 - 2{,}138)}{(39{,}9 - 51{,}3)} = 2{,}103$$

По формуле (7) рассчитывают концентрацию раствора исследуемого образца ($C_{П\ 50\%}$ (мкг/мл), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата:

$$C_{П\ 50\%} = 10^{2.103} = 126{,}97 \text{ мкг/мл}$$

Рассчитывают содержание ИБС в исследуемом образце (г/100 г) по формуле (8):

$$\text{ИБС (г/100 г)} = 100 \cdot \frac{1{,}32}{126{,}97} = 1{,}04 \text{ г/100 г}$$

Для каждого из трех взятых экстрактов анализируемого образца (п. 9.1.2 «Приготовление проб») строят свою кривую растворов двоичных разведений раствора исследуемого образца и рассчитывают содержание $ИБС_{(N)}$, как описано выше:

$ИБС_1$ = 1,04 г/100 г;

$ИБС_2$ = 0,95 г/100 г;

$ИБС_3$ = 1,04 г/100 г.

Среднее значение содержания ИБС в анализируемом образце соответственно равно:

$$ИБС_{ср} = \frac{0,95 + 1,04 + 1,04}{3} = 1,01\ г/100\ г$$

10. Определение соевого белка в мясных консервах

10.1. Подготовка проб

Отбор образцов для анализа ведут в соответствии с п. 3 настоящих методических указаний. Образцы, предназначенные для анализа, должны храниться в холодильнике без доступа света.

10.1.1. Подготовка реагентов для пробоподготовки

Проводится так же, как и в п. 9.1.1 «Подготовка реагентов для пробоподготовки».

10.1.2. Приготовление проб

Пробу мясопродукта (анализируемый образец) измельчают с использованием лабораторного гомогенизатора. Далее (12,0 ± 0,1) г гомогенизированной пробы помещают в стакан диспергатора, вносят 48 $см^3$ PBS и проводят размельчение образца мясопродукта до однородной массы при 24 000 об./мин.

Внимание! Каждую пробу анализируют в четырех параллелях, т. е. готовят четыре экстракта анализируемого образца.

Для получения четырех экстрактов анализируемого образца берут четыре аликвоты по 0,25 $см^3$ диспергата, переносят их в четыре конические колбы и взвешивают на аналитических весах.

Внимание! Массу каждой аликвоты 0,25 $см^3$ (*g*) учитывают в дальнейших расчетах п. 10.6.3.1. В каждую колбу вносят по 2,5 $см^3$ ЭБ-1. Колбы закрывают крышками и помещают на нагревательную плиту при 60 °С на 90 мин (периодически встряхивая). Затем в колбы вносят по 7,5 $см^3$ предварительно нагретого до 60 °С ЭБ-2 и проводят инкубацию в течение 90 мин на нагревательной плите при 60 °С (периодически встряхивая).

Далее охлаждают полученные экстракты до комнатной температуры. Экстракты готовы к проведению ИФА. Допускается оставлять полученные экстракты на 16 ч при 4 °С в холодильнике или в течение 2 недель при –20 °С. Размораживают на воздухе при комнатной температуре.

10.2. Подготовка стандартных образцов

В работе используются два стандартных образца с известным содержанием ИБС.

Первый стандарт готовят, как в п. 9.2 «Подготовка стандартов ИБС».

Для приготовления ***второго стандартного*** образца (Rf-стандарта) используются мясные консервы с известным содержанием ИБС (4 %), Предварительно измельченный образец консервов взвешивают и лиофильно высушивают. Далее лиофилизованный образец взвешивают, измельчают в фарфоровой ступке и рассчитывают отношение масс консервов после и до лиофилизации ($K_{влаж}$). Навеску лиофильно высушенных консервов для экстракции в ЭБ-1 и ЭБ-2 рассчитывают по следующей формуле:

$$g_{Rf}(\text{г}) = (12{,}0 \pm 0{,}1\ \text{г}) \cdot K_{влаж} \qquad (9)$$

Навеску g диспергируют в 48,0 см^3 PBS с помощью диспергатора (24 000 об./мин). 0,25 см^3 полученной взвеси переносят в коническую колбу и вносят 2,5 см^3 ЭБ-1. Инкубацию ведут при 60 °С 90 мин. Затем в колбу вносят 7,5 см^3 предварительно нагретого до 60 °С ЭБ-2 и проводят инкубацию в течение 90 мин на нагревательной плите при 60 °С.

После охлаждения до комнатной температуры образец растворяют в соотношении 1 : 4 в 0,5 %-м водном растворе НЛС, разливают по 2,0 см^3 во флаконы и лиофильно высушивают. Лиофильно высушенный образец используют в дальнейшем при проведении ИФА.

10.3. Подготовка полистирольной планшеты (сенсибилизация планшеты)

Проводится так же, как и в п. 9.3 «Подготовка полистирольной планшеты (сенсибилизация планшета)».

10.4. Подготовка реагентов для анализа

Проводится так же, как и в п. 9.2 «Подготовка реагентов для анализа».

10.5. Процедура анализа

10.5.1. Готовят раствор первого стандартного образца путем количественного перенесения лиофилизованного стандарта в мерный цилиндр и доведения конечного объема до 20 см^3 НЛС-PBS. После использования остающийся раствор стандарта следует замораживать при –20 °С. Данный стандарт пригоден к повторному использованию после оттаивания (допускается пятикратное замораживание-оттаивание). В замороженном состоянии может храниться в течение 2 месяцев.

10.5.2. Готовят раствор второго стандартного образца путем внесения во флакон с высушенным стандартом (Rf-стандартом) 2 см^3 НЛС-PBS.

10.5.3. Готовят исходные разведения исследуемых образцов путем смешивания в отдельном флаконе 0,8 см^3 НЛС-PBS и 0,2 см^3 экстракта мясопродукта.

10.5.4. Выливают сенсибилизирующий раствор из лунок, перевернув планшет, и выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания планшета по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполняют лунки 0,2 см^3 раствора фосфатного моющего буфера и снова удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок раствором фосфатного моющего буфера еще 1 раз.

10.5.5. Добавляют в каждую лунку по 0,2 см^3 раствора желатины и инкубируют 30 мин при комнатной температуре.

10.5.6. Выливают жидкость из лунок, перевернув планшет, и выбивают капли жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания планшета по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполняют лунки 0,2 см^3 раствора фосфатного моющего буфера и снова удаляют раствор из лунок. Выбивают капли жидкости, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок раствором фосфатного моющего буфера еще 2 раза.

10.5.7. Добавляют в лунки A1—B1 планшет по 0,1 см^3 раствора первого стандартного образца. Добавляют в лунки C1—D1 планшет по 0,1 см^3 раствора второго стандартного образца. Добавляют в лунки E1—F1 первой планшеты по 0,1 см^3 исходного разведения первого экстракта из анализируемого образца. Добавляют в лунки G1—H1 первой планшеты по 0,1 см^3 исходного разведения второго экстракта. Добавляют в лунки E1—F1 второй планшеты по 0,1 см^3 исходного разведения третьего экстракта из анализируемого образца. Добавляют в лунки G1—H1 второй планшеты по 0,1 см^3 исходного разведения четвертого экстракта.

Таблица 2

Разметка планшет при определении ИБС в мясных консервах

		Раститровка планшеты 1										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ст.ИБС	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
B	Ст.ИБС	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
C	Rf-ст	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
D	Rf-ст	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
E	П1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
F	П1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
G	П2	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
H	П2	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС

		Растительная планшета 2										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ст. ИБС	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
B	Ст. ИБС	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
C	Rf-ст	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
D	Rf-ст	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
E	П3	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
F	П3	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
G	П4	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС
H	П4	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/84	1/128	1/256	1/512	Б(0)	НСС

• Ст. ИБС – первое разведение раствора первого стандартного образца;

• Rf-ст – первое разведение раствора второго стандартного образца;

• П1, П2, П3, П4 – параллели экстрактов анализируемых мясных консервов;

• Б(0) – столбец, соответствующий нулевому связыванию;

• НСС – неспецифическая сорбция (ряд без внесения антител).

10.5.8. Далее по пунктам 9.5.7—9.5.14.

10.6. Обработка результатов

Расчеты производятся с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Среднее значение оптических плотностей растворов в лунках ряда А12—Н12 (НССср) вычитается из значений всех оптических плотностей растворов в остальных лунках (с использованием либо функции автоматического вычета фона прибора «Эфос9305» либо вручную).

10.6.1. Построение калибровочной кривой раствора первого стандартного образца

Рассчитывают % связывания конъюгата для каждого разведения раствора первого стандартного образца по формуле (*J*(*n*) (%):

$$J(n)\,(\%) = 100 \cdot \frac{Б_0(n) - Бп}{Б_0(n)}, \text{ где} \qquad \text{(по формуле 5)}$$

$Б_0(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для нулевого связывания;

Б(n) – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для каждого разведения раствора первого стандартного образца.

Строят калибровочную кривую раствора первого стандартного образца в координатах: ось абсцисс – % связывания конъюгата (*J* (%), ось ординат – десятичный логарифм концентрации раствора первого стандартного образца (мкг/мл) (*Lg* $C_{(мкг/мл)}$).

10.6.2. Расчет концентрации раствора первого стандартного образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата

10.6.2.1. По калибровочной кривой раствора первого стандартного образца методом линейной интерполяции рассчитывают логарифм концентрации раствора первого стандартного образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата (*Lg* (ИБС, 50 %):

$$Lg\ (ИБС,\ 50\ \%) = Lg\ C_{1cm} + (50 - J_{1cm}) \cdot \frac{Lg\ C_{2cm} - Lg\ C_{1cm}}{J_{2cm} - J_{1cm}},\ где \quad (10)$$

Lg C_{1cm} – десятичный логарифм концентрации раствора первого стандартного образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается более 50 % конъюгата;

Lg C_{2cm} – десятичный логарифм концентрации раствора первого стандартного образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается менее 50 % конъюгата;

J_{1cm} – % связывания конъюгата, соответствующий *Lg* $1_{ст}$;

J_{2cm} – % связывания конъюгата, соответствующий *Lg* $2_{ст}$.

10.6.2.2. Рассчитывают концентрацию раствора первого стандартного образца ($C_{ИБС\ 50\%}$ (мкг/мл), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата, по формуле:

$$C_{ИБС\ 50\ \%} = 10^{Lg\ (ИБС,\ 50\ \%)} \quad (11)$$

10.6.3. Расчет концентрации раствора второго стандартного образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата

10.6.3.1. Рассчитывают концентрацию раствора второго стандартного образца, соответствующую первому разведению (ряд 1 полистирольной планшеты), по формуле:

$$C_{Rf}\ (мкг/мл) = 1\ 000 \cdot \frac{g_{Rf}}{250},\ где \quad (12)$$

C_{Rf} (мкг/мл) – концентрация раствора второго стандартного образца в первом разведении;

g_{Rf} – масса 0,25 см^3 диспергата, мг (п. 10.2 «Подготовка стандартных образцов»).

10.6.3.2. Рассчитывают % связывания конъюгата для каждого разведения раствора второго стандартного образца по формуле ($J_{Rf}(n)$ (%):

$$J_{Rf}(n)\,(\%) = 100 \cdot \frac{Б_0(n) - Бп}{Б_0(n)}, \text{ где} \qquad (13)$$

$Б_0(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для нулевого связывания;

$Б(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для каждого разведения раствора второго стандартного образца.

Далее строят калибровочную кривую раствора второго стандартного образца в координатах: ось абсцисс – % связывания конъюгата (J (%), ось ординат – десятичный логарифм концентрации раствора второго стандартного образца ($Lg\ C_{Rf(мкг/мл)}$).

10.6.3.3. По калибровочной кривой раствора второго стандартного образца методом линейной интерполяции рассчитывают логарифм концентрации раствора второго стандартного образца, соответствующий 50 %-му связыванию конъюгата (Lg (Rf, 50 %):

$$Lg\ (Rf, 50\,\%) = Lg\ C_{1Rf} + (50 - J_{1Rf}) \cdot \frac{Lg\ C_{2Rf} - Lg\ C_{1Rf}}{J_{2Rf} - J_{1Rf}}, \text{ где} \qquad (14)$$

$Lg\ C_{2Rf}$ – десятичный логарифм концентрации раствора второго стандартного образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается менее 50 % конъюгата;

$Lg\ C_{1Rf}$ – десятичный логарифм концентрации раствора второго стандартного образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается более 50 % конъюгата;

J_{2Rf} – % связывания метки, соответствующий $Lg\ C_{2Rf}$;

J_{1Rf} – % связывания метки, соответствующий $Lg\ C_{1Rf}$.

10.6.4. Расчет коэффициента открытия ИБС в мясных консервах

10.6.4.1. Рассчитывают концентрацию раствора второго стандартного образца (Rf-стандарта), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата, по формуле:

$$C_{Rf\,50\%} = 10^{Lg\,(Rf.\,50\,\%)} \qquad (15)$$

10.6.4.2. Рассчитывают содержание ИБС в Rf-стандарте в % по формуле (это кажущееся содержание ИБС по калибровочной кривой раствора первого стандартного образца содержание):

$$\%\ \text{ИБС} = 100 \cdot \frac{C_{\text{ИБС }50\,\%}}{C_{Rf\ 50\,\%}} \qquad (16)$$

10.6.4.3. Рассчитывают коэффициент открытия ИБС в мясных консервах по формуле:

$$K_{откр.ИБС} = \frac{\%\ \text{ИБС}}{4} \qquad (17)$$

10.6.5. Расчет концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата

10.6.5.1. Рассчитывают концентрацию раствора исследуемого образца, соответствующую первому разведению (ряд 1 полистирольной планшеты), по формуле:

$$C\ (\text{мкг/мл}) = 1\,000 \cdot \frac{g}{250}, \text{ где} \qquad (18)$$

C (мкг/мл) – концентрация раствора исследуемого образца в первом разведении;

g – масса 0,25 см^3 диспергата, мг (п. 10.1.2 «Приготовление проб»).

10.6.5.2. Рассчитывают % связывания конъюгата для каждого разведения раствора анализируемого образца по формуле ($J(n)$ (%):

$$J(n)\ (\%) = 100 \cdot \frac{Б_0(n) - Бп}{Б_0(n)}, \text{ где} \qquad (19)$$

$Б_0(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для нулевого связывания;

$Б(n)$ – среднее значение (из двух параллельных измерений) оптической плотности для каждого разведения раствора анализируемого образца.

Далее строят кривую растительровки двоичных разведений раствора исследуемого образца в координатах: ось абсцисс – % связывания конъюгата (J (%), ось ординат – десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца ($Lg\ C_{(\text{мкг/мл})}$).

10.6.5.3. По кривой растительровки двоичных разведений раствора исследуемого образца методом линейной интерполяции рассчитывают ло-

гарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующий 50 %-му связыванию конъюгата (*Lg* (П, 50%):

$$Lg\ (П,\ 50\ \%) = Lg\ C_{1П} + (50\ -\ J_{1П}) \cdot \frac{Lg\ C_{2П} - Lg\ C_{1П}}{J_{2П}\ -\ J_{1П}}, \text{ где} \qquad (20)$$

$Lg\ C_{2П}$ – десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается менее 50 % конъюгата;

$Lg\ C_{1П}$ – десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей ближайшему разведению, при котором связывается более 50 % конъюгата;

$J_{2П}$ – % связывания метки, соответствующий $Lg\ C_{2П}$;

$J_{1П}$ – % связывания метки, соответствующий $Lg\ C_{1П}$.

10.6.5.4. Концентрацию раствора исследуемого образца соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата, рассчитывают по формуле:

$$C_{П\ 50\ \%} = 10^{Lg\ (П,\ 50\ \%)} \qquad (21)$$

10.6.6. Расчет содержания ИБС в анализируемом образце мясных консервов

Рассчитывают содержание ИБС в исследуемом образце (в г на 100 г мясных консервов) по формуле:

$$ИБС = 100 \cdot C_{ИБС\ 50\ \%} / C_{П\ 50\ \%} / K_{откр.ИБС} \qquad (22)$$

10.7. Пример расчета содержания ИБС в анализируемом образце (мясных консервах)

По калибровочной кривой раствора первого стандартного образца определяют концентрацию раствора ИБС и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению (C_{1cm} и $Lg\ C_{1cm}$), при которых связывается более 50 % конъюгата (J_{1cm}):

J_{1cm} = 61,6 %;

C_{1cm} = 3,09 мкг/мл;

$Lg\ C_{1cm}$ = 0,490.

Далее аналогичным образом определяют концентрацию раствора первого стандартного образца и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению (C_{2cm} и $Lg\ C_{2cm}$), при которых связывается менее 50 % конъюгата (J_{2cm}):

J_{2cm} = 48,6 %;

C_{2cm} =1,54 мкг/мл;

$Lg\ C_{2cm}$ = 0,189.

По формуле (10) рассчитывают десятичный логарифм концентрации раствора первого стандартного образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата (*Lg* (*ИБС*, 50 %):

$$Lg\ (\text{ИБС},\ 50\ \%) = 0{,}490 + (50 - 61{,}6)\cdot\frac{(0{,}189 - 0{,}490)}{(48{,}6 - 61{,}6)} = 0{,}223$$

По формуле (11) рассчитывают концентрацию раствора первого стандартного образца ($C_{ИБС\ 50\ \%}$ (мкг/мл), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата:

$$C_{ИБС\ 50\ \%} = 10^{0.223} = 1{,}67\ \text{мкг/мл}$$

По калибровочной кривой раствора второго стандартного образца определяют концентрацию раствора Rf-стандарта и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению (C_{1Rf} и LgC_{1Rf}), при которых связывается более 50 % конъюгата (J_{1Rf}):

$J_{1Rf} = 51{,}8$ %;

$C_{1Rf} = 73{,}11$ мкг/мл;

$Lg\ C_{1Rf} = 1{,}864$.

Далее аналогичным образом определяют концентрацию раствора первого стандартного образца и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению (C_{2Rf} и $Lg\ C_{2Rf}$), при которых связывается менее 50 % конъюгата (J_{2Rf}):

$J_{2Rf} = 34{,}8$ %;

$C_{2Rf} = 36{,}56$ мкг/мл;

$Lg_{2Rf} = 1{,}563$.

По формуле (14) рассчитывают десятичный логарифм концентрации раствора второго стандартного образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата (*Lg* (*Rf*, 50 %):

$$Lg\ (Rf,\ 50\ \%) = 1{,}864 + (50 - 51{,}8)\cdot\frac{(1{,}563 - 1{,}864)}{(34{,}8 - 51{,}8)} = 1{,}831;$$

По формуле (15) рассчитывают концентрацию раствора второго стандартного образца ($C_{Rf\ 50\ \%}$ (мкг/мл), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата:

$$C_{Rf\ 50\ \%} = 10^{1.831} = 67{,}82\ \text{мкг/мл}$$

По формуле (16) рассчитывают содержание ИБС в Rf-стандарте в % (это кажущееся содержание ИБС по калибровочной кривой раствора первого стандартного образца содержание):

$$ИБС_{Rf} = 100\cdot\frac{1{,}67}{67{,}82} = 2{,}46\ \text{г}/100\ \text{г}$$

По формуле (17) рассчитывают коэффициент открытия ИБС в мясных консервах:

$$K_{откр.\ ИБС} = \frac{2,46}{4} = 0,615$$

По калибровочной кривой растительности двоичных разведений раствора исследуемого образца определяют концентрацию раствора исследуемого образца и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению ($C_{1П}$ и $Lg\ C_{1П}$), при которых связывается более 50 % конъюгата ($J_{1П}$):

$J_{1П} = 57,4$ %;

$C_{1П} = 292,8$ мкг/мл;

$Lg\ C_{1П} = 2,466$.

Далее аналогичным образом определяют концентрацию раствора исследуемого образца и ее десятичный логарифм, соответствующие ближайшему разведению ($C_{2П}$ и $Lg\ C_{2П}$), при которых связывается менее 50 % конъюгата ($J_{2П}$):

$J_{2П} = 46,1$ %;

$C_{2П} = 146,4$ мкг/мл;

$Lg\ C_{2П} = 2,165$.

По формуле (20) рассчитывают десятичный логарифм концентрации раствора исследуемого образца, соответствующей 50 %-му связыванию конъюгата, ($Lg\ (П,\ 50\ \%)$):

$$Lg\ (П,\ 50\ \%) = 2,466 + (50 - 57,4) \cdot \frac{(2,165 - 2,466)}{(46,1 - 57,4)} = 2,270$$

По формуле (21) рассчитывают концентрацию раствора исследуемого образца ($C_{П\,50\,\%}$ (мкг/мл), соответствующую 50 %-му связыванию конъюгата:

$$C_{П\,50\,\%} = 10^{2.270} = 186,1 \text{ мкг/мл}.$$

Рассчитывают содержание ИБС в исследуемом образце (в г/100 г) по формуле (22):

$$ИБС = 100 \cdot 1,67/\ 186,1\ /\ 0,615 = 1,46 \text{ г/100 г}.$$

Для каждого из четырех взятых экстрактов анализируемого образца (п. 10.1.2 «Приготовление проб») строят свою кривую растительности двоичных разведений раствора исследуемого образца и рассчитывают содержание $ИБС_{(N)}$, как описано выше:

$ИБС_1 = 1,46$ г/100 г;

$ИБС_2 = 1,49$ г/100 г;

$ИБС_3$ = 1,52 г/100 г;
$ИБС_4$ = 1,54 г/100 г.

Среднее значение содержания ИБС в анализируемом образце соответственно равно:

$$ИБС_{ср} = (1,46 + 1,49 + 1,58 + 1,54)/4 = 1,50 \text{ г/100 г.}$$

11. Оценка приемлемости результатов параллельных определений

11.1. Проверяют приемлемость полученных результатов параллельных определений. Расхождение между минимальным и максимальным из полученных N ($N = 3$ для колбасных изделий, $N = 4$ для мясных консервов) результатов параллельных определений анализируемой пробы не должно превышать предела повторяемости r_m, приведенного в табл. 1 для колбасных изделий и табл. 2 для мясных консервов.

Результаты считают приемлемыми при выполнении условия:

$$(x_{max} - x_{min}) \le r_m \text{, где} \qquad (23)$$

где x_{max}, x_{min} – максимальное и минимальное значения n результатов параллельных определений соответственно, г/100 г.

Если выполняется условие приемлемости (23) за результат измерений принимают среднее арифметическое n параллельных определений.

11.2. Если условие (23) не выполняется, получают еще n результатов параллельных определений анализа. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов $2n$ определений, если выполняется условие:

$$(x_{max} - x_{min}) \le CR_{0,95}(2n) \qquad (24)$$

$$CR_{0,95}(2n) = f(2n)\,\sigma_r \text{, где} \qquad (25)$$

x_{max}, x_{min} – максимальное и минимальное значения из полученных $2n$ результатов параллельных определений ИБС, г/100 г;

$CR_{0,95}$ – значение критического диапазона для уровня вероятности $P = 0,95$;

$f(n)$ – коэффициент критического диапазона ($f(6)$ (для колбасных изделий) = 4,0; $f(8)$ для мясных консервов = 4,3);

Если условие (24) не выполняется, выполнение анализов прекращают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

12. Оформление результатов измерений

Результат количественного определения ИБС в мясных продуктах методом конкурентного ИФА представляют в виде:

$(X \pm \Delta)$, г/100 г ИБС в мясном продукте, при доверительной вероятности $P = 0,95$, где X – результат измерений, полученный в соответствии с настоящей методикой; Δ – абсолютная погрешность измерений, г/100 г при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Результаты анализа оформляют протоколом.

13. Контроль качества результатов измерений

13.1. Контроль промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности

При контроле промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности абсолютное значение разности двух результатов анализа $|X_1 - X_2|$ одной и той же пробы, полученных в условиях промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности, не должно превышать предела промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности R_m, т. е. с доверительной вероятностью $P = 0,95$ должно выполняться условие:

$$|X_1 - X_2| \leq R_m \qquad (26)$$

Значения R_m приведены в табл. 3 для колбасных изделий и табл. 4 для мясных консервов.

Если указанное соотношение не выполняется, выполнение анализов прекращают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

13.2. Контроль правильности результатов анализа

Контроль правильности результатов анализа проводят раз в год путём анализа контрольных образцов. В качестве контрольных образцов могут быть использованы образцы мясных продуктов с заранее известным содержанием ИБС.

Абсолютное значение разности результата анализа контрольного образца (X) и принятого опорного значения (X_{am}) не должно превышать критического значения K, т. е. с доверительной вероятностью P = 0,95 должно выполняться условие:

$$|X - X_{am}| \leq K \qquad (27)$$

Критическое значение K вычисляют по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta_{am}^2 + \Delta^2}\text{, где} \qquad (28)$$

Δ_{am} – погрешность установления опорного значения содержания ИБС в контрольном образце;

Δ – граница интервала, в котором с вероятностью $P = 0,95$ находится погрешность результата анализа X. Значения Δ приведены в табл. 3 для колбасных изделий и табл. 4 для мясных консервов.

Таблица 3

Основные метрологические показатели методики количественного определения ИБС методом непрямого ИФА в колбасных изделиях

Метрологическая характеристика ($p = 0,95$)	Диапазон концентраций ИБС, г/100 г	
	0,2—1,0	1,0—10
Предел повторяемости (r_m), г/100 г	0,1	0,6
Предел воспроизводимости (R_m), г/100 г	0,2	0,9
Предел точности (Δ), г/100 г	0,1	0,5

Таблица 4

Основные метрологические показатели методики количественного определения ИБС методом непрямого ИФА в мясных консервах

Метрологическая характеристика ($p = 0,95$)	Диапазон концентраций ИБС, г/100г	
	0,2—1,0	1,0—10
Предел повторяемости (r_m), г/100 г	0,1	0,6
Предел воспроизводимости (R_m), г/100 г	0,2	0,6
Предел точности (Δ), г/100 г	0,1	0,3

Результат вычислений округляют до первого значащего знака после запятой.

Определение изолята соевого белка в составе мясных продуктов

Методические указания
МУК 4.1.2881—11

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 30.09.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,0
Тираж 200 экз. Заказ 125

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

gost.e-ecolog.ru