

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ВЕЩЕСТВ И МАТЕРИАЛОВ

Научная статья

УДК 57.083.32:616–097:635.655

<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-5-127-141>



# Методика измерений массовой доли соевого ингибитора трипсина: особенности разработки и аттестации

О. Е. Первухина<sup>1</sup>  , М. П. Крашенинина<sup>1</sup> , П. А. Петухов<sup>2</sup>, В. Н. Майгурова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Уральский научно-исследовательский институт метрологии – филиал ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева», г. Екатеринбург, Россия  
 [pervuhinaoe@uniim.ru](mailto:pervuhinaoe@uniim.ru)

<sup>2</sup>ООО «ХЕМА», г. Москва, Россия  
 [onco.xema@gmail.ru](mailto:onco.xema@gmail.ru)

**Аннотация:** Современная индустриализация повышает требования к точности определения аллергенов, особенно в отношении оказывающих негативное воздействие, среди них – соевый ингибитор трипсина (СИТ). Корректное определение наличия СИТ в пищевых продуктах, содержащих соевые бобы, является ключевым для контроля безопасности и маркировки продукции. Сложилась общепринятая практика определять аллергены сои количественно с помощью аналитических методов анализа. Авторы данной статьи поставили цель разработать и аттестовать методику измерений массовой доли СИТ методом иммуноферментного анализа – методику, способную повысить специфичность метода и избежать ложноотрицательных результатов ее применения.

Объектом исследования стал метод анализа пищевых аллергенов – иммуноферментный анализ, реализованный набором реагентов производства ООО «ХЕМА». В процессе разработки методики измерений оптимизированы основные методические факторы, влияющие на точность результатов измерений: масса пробы, время ее экстракции, время и скорость центрифугирования пробы, соотношение надосадочной жидкости и ИФА-буфера, температура инкубации, время взаимодействия комплекса антитело-аллерген с окрашивающим агентом, длина волны для измерения оптической плотности и максимальное время для измерения оптической плотности после введения стоп-реагента. Разработанная методика апробирована в ходе межлабораторного эксперимента с участием 5 лабораторий. Метрологические характеристики установлены в соответствии с РМГ 61–2010. Предлагаемый метод был аттестован в соответствии с требованиями ГОСТ Р 8.563-2009, № 102–ФЗ. Метод имеет широкий диапазон количественного определения массовой доли СИТ от 0,5 до 25,0 мкг/кг (ppb) с пределом обнаружения 0,1 мкг/кг (ppb) и относительной погрешностью 40%.

По результатам проведенного исследования в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений (ФИИ) зарегистрирована аттестованная методика идентификации и количественного определения содержания неинфекционных пищевых аллергенов белкового растительного происхождения в пробах всех видов пищевых продуктов и объектов, связанных с требованиями к пищевой продукции, смывов, отбираемых с рабочих поверхностей при проведении производственного контроля, с помощью наборов реагентов для иммуноферментного анализа производства ООО «ХЕМА» № ФР.1.31.2022.43884.

Методика предназначена для применения в испытательных лабораториях, занимающихся контролем качества и безопасности выпускаемой продукции, может быть использована для подтверждения соответствия продукции обязательным требованиям, установленным в Техническом регламенте Таможенного союза ТР ТС 022/2012.

**Ключевые слова:** пищевая аллергия, аллергены, методика измерений, иммуноферментный анализ, соевый ингибитор трипсина

**Ссылка при цитировании:** Методика измерений массовой доли соевого ингибитора трипсина: особенности разработки и аттестации / О. Е. Первухина [и др.] // Эталоны. Стандартные образцы. 2023. Т. 19, № 5. С. 127–141. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-5-127-141>

Статья поступила в редакцию 02.05.2023; одобрена после рецензирования 25.11.2023; принята к публикации 25.12.2023.

## MODERN METHODS OF ANALYSIS OF SUBSTANCES AND MATERIALS

Research Article

# Method for Measuring the Mass Fraction of Soybean Trypsin Inhibitor: Features of Development and Certification

Olesya E. Pervukhina<sup>1</sup>  , Maria P. Krasheninina<sup>1</sup> , Pavel A. Petukhov<sup>2</sup>, Valentina N. Maigurova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UNIIM – Affiliated Branch of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology, Yekaterinburg, Russia

 pervuhinaoe@uniim.ru

<sup>2</sup> LLC HEMA, Moscow, Russia

 onco.xema@gmail.ru

**Abstract:** Modern industrialization increases the requirements for the accuracy of identifying allergens, especially those that have a negative impact – soy trypsin inhibitor (STI). Correct determination of the presence of STI in food products containing soybeans is key for product safety control and labeling. The authors set a goal to develop and certify a method for measuring the mass fraction of STI using an enzyme-linked immunosorbent assay – a technique that may increase the specificity of the method and avoid false-negative results.

The object of research was a method for analyzing food allergens – an enzyme-linked immunosorbent assay carried out with a set of reagents produced by XEMA LLC. In the process of developing the measurement method, the main methodological factors influencing the accuracy of the measurement results were optimized: sample weight, time of its extraction, time and speed of sample centrifugation, ratio of supernatant liquid to ELISA buffer, incubation temperature, interaction time of the allergen-antibody complex with the coloring agent, the wavelength for measuring absorbance, and the maximum time for measuring absorbance after introduction of the stop reagent.

The developed method was tested during an interlaboratory experiment with the participation of 5 laboratories. Metrological characteristics were established in accordance with RMG 61–2010. The proposed method was certified in accordance with the requirements of GOST R8.563–2009, No. 102–FZ. The method has a wide range of quantitative determination of the mass fraction of STI from 0.5 to 25.0 µg/kg (ppb) with a detection limit of 0.1 µg/kg (ppb) and a relative error of 40%. Based on the results of the research, the Federal Information Fund for Ensuring the Uniformity of Measurements (FIF) registered a certified method for identifying and quantifying the content of non-infectious food allergens of plant protein origin in samples of all types of food products and objects related to the requirements for food products, swabs taken from working surfaces during production control using reagent kits for an enzyme-linked immunosorbent assay produced by XEMA LLC No. FR.1.31.2022.43884.

The method is intended for use in testing laboratories involved in monitoring the quality and safety of manufactured products; it can be used to confirm product compliance with the mandatory requirements established in the Technical Regulations of the Customs Union TR CU022/2012.

**Keywords:** food allergy, allergens, measurement method, enzyme-linked immunosorbent assay, soybean trypsin inhibitor

**For citation:** Pervukhina O. E., Krasheninina M. P., Petukhov P. A., Maigurova V. N. Method for measuring the mass fraction of soybean trypsin inhibitor: features of development and certification. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(5):127–141. (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-5-127-141>

**Принятые сокращения:** MALDI-TOF MS – метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией; ИФА – метод иммуноферментного анализа; ПЦР – метод полимеразной цепной реакции; СИТ – соевый ингибитор трипсина; СКО – среднеквадратическое отклонение.

The article was submitted 02.05.2023; approved after reviewing 25.11.2023; accepted for publication 25.12.2023.

## Введение

Контроль содержания аллергенов в пищевых продуктах играет важную роль в обеспечении их безопасности, что особенно необходимо людям, восприимчивым к аллергенам. Единственным эффективным способом лечения и профилактики пищевой аллергии человека является строгое соблюдение гипоаллергенной диеты на протяжении всей жизни. Однако не всегда пищевые продукты, которые должны быть свободны от аллергенов, фактически не содержат их. Именно поэтому требуется осуществлять надлежащий контроль за товарами, наличие аллергенов в которых может носить производственный характер.

Пищевая аллергия имеет распространенность у детей – в 6–8% случаев и в 2–3% случаев – у взрослых. В последние 10 лет отмечается устойчивая тенденция к увеличению распространенности аллергии [1]. Пищевая аллергия – патологическая реакция иммунной системы организма, вызванная повторным воздействием аллергена (антигена). Аллергены чаще всего – простые или сложные (гликопротеиды) белки, в структуре которых присутствует эпитоп – специфичный участок, отвечающий за связь с антителами иммунной системы. Молекулярная масса большинства пищевых аллергенов составляет (10 000–70 000) Да [2–4].

Международный пищевой кодекс<sup>1</sup> устанавливает так называемую «большую восьмерку» аллергенов [2, 3, 5, 6], в которую входят продукты с наиболее ярко выраженными аллергенными свойствами: коровье молоко, куриное яйцо, пшеница, арахис, орехи, соевые бобы, рыба и морепродукты (ракообразные и моллюски). Из данного перечня в качестве объекта исследования были выбраны соевые бобы, поскольку они имеют широкое распространение в пищевой промышленности [8] по причине их высокой пищевой ценности [7]. Соя часто служит текстуратором, эмульгатором и источником белка [9]. Кроме полезных свойств, соевые

бобы содержат аллерген – соевый ингибитор трипсина (СИТ) [10]. Отличительной особенностью данного аллергена является термостабильность – способность восстанавливать свою структуру после термической обработки при 60 °С, обращая денатурацию вспять [11]. Указанная способность обусловлена наличием двух дисульфидных связей [12], поэтому трипсин не разрушается в ходе технологических процессов и может оставаться в качестве скрытого аллергена.

Требования к контролю содержания аллергенов в продуктах питания установлены в ряде правовых актов, таких как Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011 и международном документе Codex Alimentarius [6]. Согласно этим требованиям, производитель обязан указывать наличие аллергенов в составе продукта, независимо от их количества.

Существует широкий набор различных методов анализа, которые можно использовать для качественного и количественного определения аллергенов. Они основаны на разных физико-химических принципах и включают такие часто используемые методы, как иммуноферментный анализ (ИФА), времяпролетная масс-спектрометрия с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS), полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование (NGS) [11].

Большинство этих методов исследования позволяет обнаружить наличие пищевых аллергенов [1, 13], однако они не всегда могут быть использованы для их количественного определения, что, согласно ТР ТС 022/2011, не соответствует современным требованиям законодательства в части метрологического обеспечения. Сравнение методов, применяемых для анализа аллергенов, приведено в табл. 1.

Метод ПЦР основан на идентификации ДНК, которая кодирует целевой антиген. Однако существуют данные [14, 15, 16], вызывающие сомнения относительно обнаружения ДНК соевых бобов в обработанных пищевых продуктах, так как они могут вызвать перекрестную реакцию с несколькими другими продуктами, включая ячмень и гречку. Метод MALDI-TOF MS подходит для количественного определения пищевого аллергена,

<sup>1</sup> Codex Alimentarius – свод пищевых международных стандартов, принятых Международной комиссией Всемирной организации здравоохранения по внедрению кодекса стандартов и правил по пищевым продуктам.

Таблица 1. Обзор методов анализа применяемых для качественного и количественного определения пищевых аллергенов

Table 1. An overview of analytical methods used for the qualitative and quantitative determination of food allergens

Методы анализа	Метрологические характеристики	Специальные требования к помещению	Сложность анализа	Стоимость оборудования
ИФА	ПГО ± (20–50) %	Нет	Низкая	1 млн руб.
MALDI-TOF MS	ПГО ± (10–25) %	Да	<b>Высокая</b>	<b>20 млн руб.</b>
ПЦР	<b>Качественный анализ</b>	Да	Низкая	3 млн руб.
Секвенирование	ПГО ± (20–40) %	Нет	<b>Высокая</b>	<b>5 млн руб.</b>

но требует дорогостоящего оборудования, высококвалифицированного персонала и высокочистых стандартных образцов [17, 18]. Метод ИФА, в частности – сэндвич-метод, обладает рядом преимуществ, таких как высокая специфичность, низкий предел обнаружения, меньшее влияние матричных эффектов за счет использования двух специфичных антител [19], техническая простота и невысокие требования к оборудованию [20].

Представленные в табл. 1 данные наглядно характеризуют наиболее часто применяемые методы: MALDI-TOF MS и секвенирование обеспечивают более высокую точность, в то время как метод ИФА имеет свои преимущества, такие как низкая стоимость оборудования, простота в использовании и рекомендации Комиссии Codex Alimentarius для определения пищевых аллергенов [6].

Цель данного исследования – разработка и аттестация методики измерений массовой доли соевого ингибитора трипсина методом иммуноферментного анализа.

В исследовании установлен следующий перечень задач: оптимизация факторов, влияющих на результаты измерений; анализ групп ОКПД2 для анализа пищевых продуктов, входящих в область применения методики, и выбора наиболее характерного представителя из каждой группы; организация и проведение межлабораторного эксперимента; расчет показателей точности методики измерений.

## Материалы и методы

### Объект исследований

Учитывая, что производные соевых бобов, такие как соевая мука и соевый изолят, часто применяются в пищевой продукции, которая, в свою очередь, содержит СИТ, а ИФА признан Комиссией Codex Alimentarius как рекомендованный метод для рутинного определения содержания аллергенов в пищевых ингредиентах и готовых продуктах питания, то объектом исследования

выбран иммуноферментный анализ, реализованный набором реагентов «Соевый ингибитор трипсина-ИФА», произведенных ООО «ХЕМА».

### Оборудование и материалы

Методика измерений реализована на оборудовании:

- весы лабораторные электронные I (специального) класса точности по ГОСТ OIML R76–1, максимальная нагрузка 200 г, дискретность 0,1 мг, производства фирмы Sartorius AG, (Германия), зарегистрированы в ФИФ ОЕИ № 28158–04;
- иммуноферментный анализатор Multiskan FC производства фирмы Thermo Fisher Scientific (США), зарегистрирован в ФИФ ОЕИ № 54959–13;
- спектрофотометр UV/VIS Excellence модель UV5 производства фирмы Mettler-Toledo AG (Швейцария), зарегистрирован в ФИФ ОЕИ № 64436–16;
- термостат суховоздушный или инкубатор, поддерживающий температуру (37 ± 2) °С;
- центрифуга медицинская;
- встряхиватель IKA Vibrax VXR basic.

### Реактивы

В работе использовали реактивы: спирт этиловый в соответствии с ГОСТ Р 55878–2013; вода дистиллированная в соответствии с ГОСТ Р 58144–2018; CRM (Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean), Product Number: T9128, Lot.#SLBR5919V) стандартный образец состава СИТ (соевых бобов) с массовой долей основного вещества не менее 95,00 %.

### Метод измерения

Исследование проводили с использованием метода ИФА. Данный метод является иммунологическим и основан на взаимодействии антитела и специфического антигена [20]. При разработке и аттестации методики измерений применяли набор реагентов ООО «ХЕМА»,

в котором использовали неконкурентный (сэндвич) иммуноферментный метод, обладающий самым высоким уровнем чувствительности и специфичности из-за использования пары совпадающих антител [19, 21]. На лунках микропланшета адсорбированный антителом, чувствительные к антигену, после внесения экстракта пробы образуется комплекс «антиген – антитело». Поскольку в экстракте находятся вещества, не связывающиеся с антителами, их удаляли путем промывки, после чего добавляли конъюгат с пероксидазой хрена – ферментом, широко применяемым в ИФА [13]. Затем производили повторную отмывку, после которой вносили хромоген-субстратную смесь и стоп-раствор. Затем проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре на длине волны 450 нм, бланк спектрофотометра (фоновый раствор) выставляли по дистиллированной воде.

В сэндвич-ИФА цвет (оптическая плотность) напрямую связывали с количеством целевого аллергена, присутствующего в экстрагированном образце пищевого продукта [13].

### Разработка и аттестация методики измерений

#### Разработка методики измерений

В процессе разработки методики измерений массовой доли СИТ была проведена оптимизация основных методических факторов, влияющих на точность результатов измерений: масса пробы, время ее экстракции, время и скорость центрифугирования пробы, соотношение надосадочной жидкости и ИФА-буфера, температура инкубации, время взаимодействия комплекса «антитело – аллерген» с окрашивающим агентом, длина волны для измерения оптической плотности и максимальное время для измерения оптической плотности после введения стоп-реагента.

Поиски оптимальных параметров методики проводили путем варьирования основных методических параметров и анализа их влияния на результаты измерений массовой доли СИТ.

При выборе массы навески пробы были проведены измерения массовой доли СИТ при разных массах навески в 5 параллельных измерениях. На рис. 1 выполнено графическое представление результатов расчетов, которые отражают относительное среднее квадратическое отклонение результатов измерений массовой доли СИТ для каждой навески. Установлено, что при массе навески, равной 1 г, наблюдается уменьшение разброса результатов измерений; при дальнейшем увеличении массы навески изменение разброса результатов измерений не наблюдается, однако приводит к увеличению расхода

реактивов. Таким образом, выбрана оптимальная масса навески пробы 1 г.

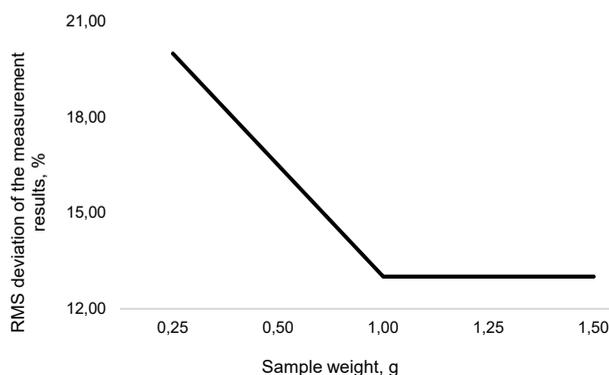


Рис. 1. График зависимости массы навески пробы от СКО результатов измерений

Fig. 1. The graph of the dependence of the mass of a sub-sample on the standard deviation of the measurement results

В процессе экстракции анализируемых проб пищевых продуктов был использован натрий-фосфатный буфер, который оказался оптимальным для извлечения СИТ из пищевых продуктов по причине его нетоксичности. Исследования, проведенные для определения оптимального времени экстракции пробы, показали, что максимальная массовая доля СИТ достигалась при времени удерживания в 30 минут. Как видно на рис. 2, при времени удерживания, равном 30 минутам, наблюдается максимальное значение массовой доли СИТ, при этом увеличение времени не приводит к увеличению массовой доли СИТ, но приводит к увеличению времени выполнения измерений.

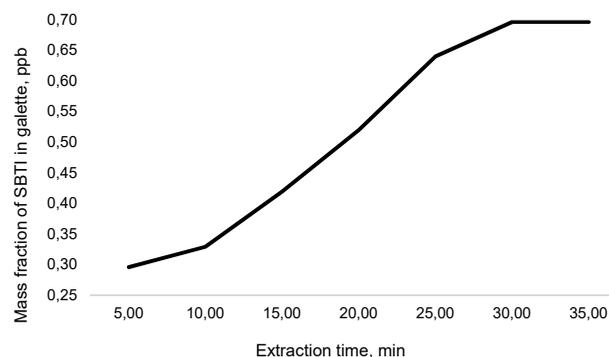


Рис. 2. График зависимости времени экстракции от массовой доли соевого ингибитора трипсина

Fig. 2. The graph of the dependence of the extraction time on the mass fraction of soybean trypsin inhibitor

Массовая доля СИТ также зависит от времени воздействия стоп-реагента: чем дольше – тем выше значения оптической плотности (массовая доля СИТ имеет прямую зависимость от оптической плотности). Таким

образом, требовалось установить максимальное время, в течение которого необходимо провести измерения оптической плотности после введения стоп-реагента. Как видно на рис. 3, максимальное время измерения оптической плотности после введения стоп-реагента составляет 15 минут, далее происходит существенное увеличение оптической плотности, что приводит к значительному превышению результатов измерений массовой доли СИТ.

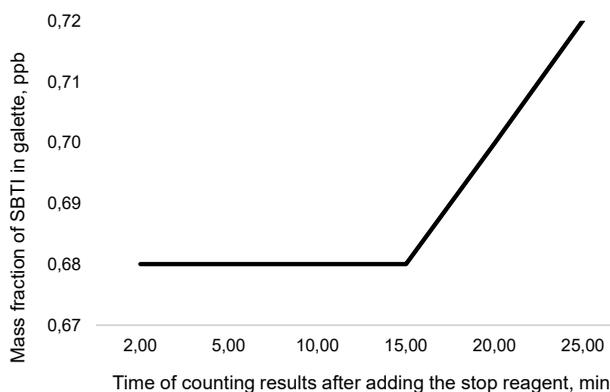


Рис. 3. График зависимости времени действия стоп-реагента от массовой доли соевого ингибитора трипсина

Fig. 3. The graph of the dependence of the action time of the stop reagent on the mass fraction of soybean trypsin inhibitor

Установленная методикой измерений длина волны подтверждена путем получения спектра зависимости оптической плотности от длины волны на спектрофотометре UV/VIS Excellence, модель UV5 Mettler Toledo. На рис. 4 зафиксировано, что длина волны 450 нм соответствует максимальной чувствительности.

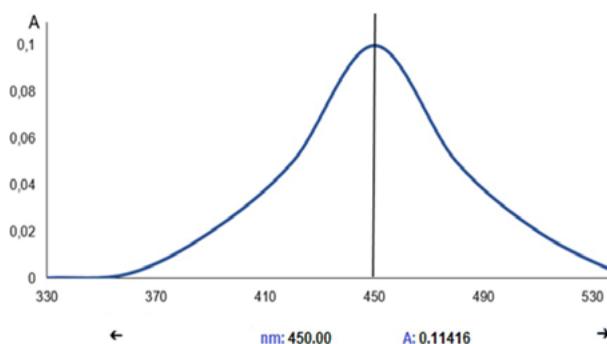


Рис. 4. Зависимость оптической плотности от длины волны  
Fig. 4. Dependence of optical density on wavelength

Проведены работы по разработке, аттестации и проверке применимости методики измерений массовой доли соевого ингибитора трипсина в пробах всех видов пищевых продуктов и объектов, связанных

с требованиями к пищевой продукции, смывов, отбираемых с рабочих поверхностей при проведении производственного контроля, методом иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов «Соевый ингибитор трипсина-ИФА» производства ООО «ХЕМА», а также подготовлена серия документов под общим названием «Методики идентификации и количественного определения содержания неинфекционных пищевых аллергенов белкового растительного происхождения в пробах всех видов пищевых продуктов и объектов, связанных с требованиями к пищевой продукции, смывов, отбираемых с рабочих поверхностей при проведении производственного контроля, с помощью наборов реагентов для иммуноферментного анализа производства ООО «ХЕМА». Часть 1».

В результате были установлены основные оптимальные методические параметры и разработана схемы выполнения методики измерений. Основные оптимальные методические параметры представлены в табл. 2. Схема методики измерений приведена на рис. 5.

С целью корректного и обоснованного определения области применения методики измерений требовалось установить круг образцов (пищевых продуктов), на которых необходимо провести набор статистических данных для расчета показателей точности методики измерений.

Для выбора образцов был проведен анализ групп ОКПД2 (Общероссийский классификатор продукции по видам экономической деятельности) и были отобраны наиболее характерные представители из каждой группы, дополнительно отбирали смывы с рабочих поверхностей. Общее количество проб составило 34: ячмень, семена кунжута, рис коричневый, фарш куриный из филе грудки, фарш из говядины, фарш из свинины, креветки вареные замороженные, филе трески замороженное, томаты консервированные, ананасы консервированные, лисички замороженные, молоко безлактозное, сыр «Российский», творог 9%, мука ржаная, отруби овсяные, мука гречневая, галеты мультизлаковые, пирожное бисквитное, крупа кускус, шоколад молочный, яйцо вареное, смесь сухая молочная для питания детей, пудинг шоколадный, изолят сывороточного белка, каша овсяная быстрого приготовления, напиток молочный овсяный, напиток молочный миндальный, ароматизатор «Ваниль». Область применения методик измерений приведен в табл. 3.

#### Аттестация методики измерений

Для процедуры проведения аттестации методики измерений массовой доли СИТ был организован и проведен межлабораторный эксперимент с участием пяти

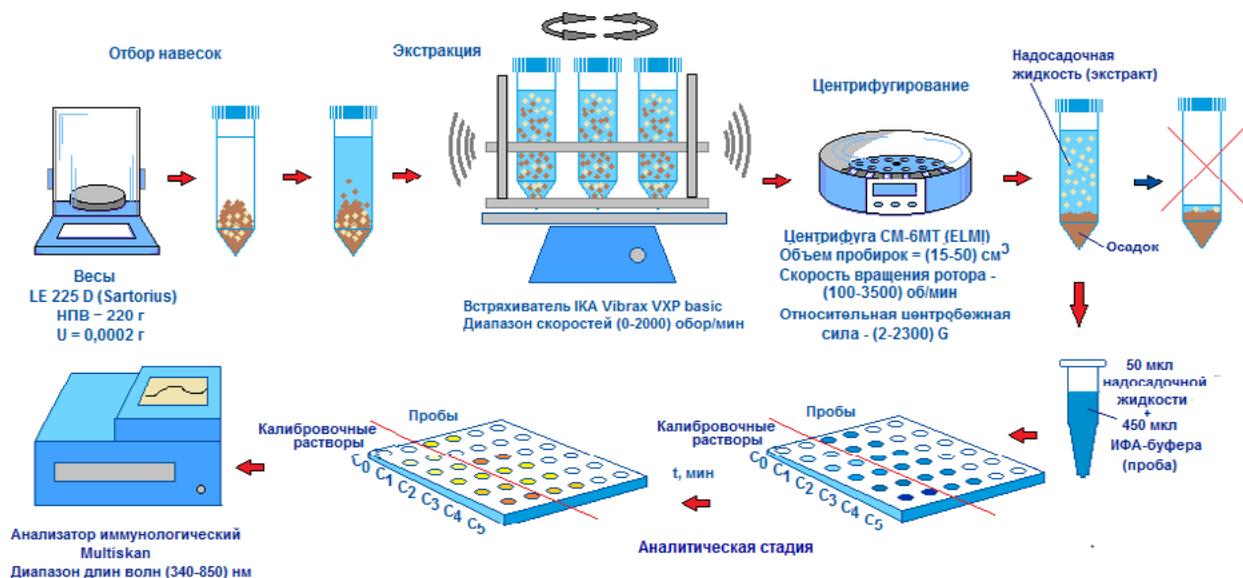


Рис. 5. Схема методики измерений «Методика измерений массовой доли соевого ингибитора трипсина в пробах всех видов пищевых продуктов и объектов, связанных с требованиями к пищевой продукции, смывов, отбираемых с рабочих поверхностей при проведении производственного контроля, методом иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов «Соевый ингибитор трипсина-ИФА» производства ООО «ХЕМА». Адаптировано из [22]

Fig. 5. The scheme of the measurement method «Method for measuring the mass fraction of soybean trypsin inhibitor in samples of all types of food products and objects related to the requirements for food products, swabs taken from working surfaces during production control by enzyme-linked immunosorbent assay using reagent kits «Soybean inhibitor trypsin-ELISA» produced by XEMA LLC». Adapted from [22]

Таблица 2. Методические параметры, влияющие на точность измерений методики измерений массовой доли СИТ

Table 2. Methodological parameters affecting the measurement accuracy of the method for measuring the mass fraction of STI

№ фактора влияния	Методический параметр	Оптимальное значение методического параметра
1	Масса навески	1 г
2	Время экстракции	30 мин
3	Время центрифугирования	10 мин
4	Скорость центрифугирования	3 000 об/мин
5	Температура инкубации	37 °С
6	Длина волны	450 нм
7	Время взаимодействия комплекса антитело-аллерген с ТМБ (окрашивающий агент)	15 мин
8	Максимальное время проведения измерения оптической плотности после введения стоп-реагента	15 мин

Таблица 3. Область применения методики измерений в соответствии с Общероссийским классификатором продукции по видам экономической деятельности ОК 034-2014  
Table 3. The application of the measurement method in accordance with the All-Russian Classification of Products by Economic Activities ОК 034-2014

Код ОКПД2	Объект измерений
01.11	Культуры зерновые (кроме риса), зернобобовые, семена масличных культур
10.1	Мясо и мясо птицы, прочие продукты убоя. Мясные пищевые продукты, включая продукты из мяса птицы
10.2	Рыба переработанная и консервированная, ракообразные и моллюски
10.3	Фрукты и овощи переработанные и консервированные
10.5	Молоко и молочная продукция
10.6	Продукция мукомольно-крупяного производства, крахмалы и крахмалопродукты
10.7	Изделия хлебобулочные и мучные кондитерские
10.8	Продукты пищевые прочие
10.89.19	Продукты пищевые прочие, не включенные в другие группировки
10.89.19.150	Добавки пищевые, в т. ч. комплексные
11.07.19.133	Напитки на растительном сырье
24.63.10.160	Ароматизаторы на основе смесей вкусоароматических веществ, смеси душистых веществ, используемые в производстве пищевых продуктов, включая напитки
24.63.10.163	Ароматизаторы, используемые в производстве пищевых продуктов

лабораторий. Метод оценки показателей точности – метод добавок. Отобранные 34 образца были предварительно проверены на содержание целевого антигена с помощью скринингового анализа – тест-полоска на основе иммунохроматографического принципа производства ООО «ХЕМА» (рис. 6, 7).

В качестве добавки применяли аттестованные растворы, приготовленные из CRM Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean), с массовой долей основного вещества не менее 95,00%.

Готовили растворы для введения добавки из СО путем разбавления точно известной навески СО в сухой форме в буфере для экстракции проб следующим образом.

В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> помещали навеску СО массой 10 мг, отобранную при помощи весов неавтоматического действия I (специального) класса точности по ГОСТ OIML R 76–1–2011, затем с помощью мерного цилиндра вместимостью 50 см<sup>3</sup> добавляли

рабочий раствор буфера для экстракции, объем раствора доводили до метки рабочим буферным раствором для экстракции и тщательно перемешивали.

Массовую концентрацию СИТ в стандартном растворе, приготовленном из СО ( $C_{CO}$ , мкг/см<sup>3</sup>), рассчитывали по формуле (1)

$$C_{CO} = \frac{m_{CO} \cdot W_{CO} \cdot 10^6}{V_{p-ля} \cdot 100}, \quad (1)$$

где  $W_{CO}$  – массовая доля основного вещества (СИТ) в СО (в соответствии с сертификатом анализа), %;

$m_{CO}$  – масса навески СО состава СИТ, г;

$V_{p-ля}$  – объем аликвоты растворителя, см<sup>3</sup>;

Границы абсолютной погрешности приготовления стандартного раствора № 1 с массовой концентрацией СИТ по (1), при доверительной вероятности  $P=0,95$  (без учета знака), ( $\Delta C_{RM}$ , мкг/см<sup>3</sup>) рассчитывали по формуле (2)



Рис. 6. Результат проверки образца ячменя с помощью тест-полоски

Fig. 6. The result of testing a barley sample using a test strip



Рис. 7. Результат проверки образца фарша куриного из филе грудки с помощью тест-полоски

Fig. 7. The result of testing a sample of chicken minced breast fillet using a test strip

$$\Delta C_{CO} = C_{CO} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta U_{CO}}{W_{CO}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta m_{CO}}{m_{CO}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{P-ля.}}{V_{P-ля.}}\right)^2}, \quad (2)$$

где  $\Delta m_{CO}$  – пределы допускаемой абсолютной погрешности весов лабораторных I (специального) класса точности по ГОСТ OIML R 76–1 при нагрузке  $m$ , г;

$\Delta V_{м.к.}$  – пределы допускаемой абсолютной погрешности мерной колбы, использованной для приготовления раствора по ГОСТ 1770, см<sup>3</sup>;

$\Delta U_{CO}$  – пределы допускаемой абсолютной погрешности аттестованного значения при  $P=0,95, \%$ .

Расчет массовой концентрации стандартного раствора № 1, приготовленного из СО состава СИТ, приведен в табл. 4.

Таблица 4. Приготовление стандартного раствора № 1

Table 4. Preparation of standard solution No. 1

№ стандартного раствора	$W_{CO}^*$ , %	$V_{P-ля.}$ · см <sup>3</sup>	$m_{CO}$ · г	$C_{CO}$ , мкг/см <sup>3</sup>	$\delta C_{CO}$ , %
Раствор № 1	100,00	50,00	0,010	200,00	7,63

\*Значение, установленное в сертификате на RM.

Приготовление рабочих растворов СИТ, приготовленных в соответствии с табл. 5, выполняли методом последовательного разбавления точно известной аликвоты стандартного раствора № 1 в растворителе.

Массовую концентрацию СИТ в рабочих растворах ( $C_{PP}$ , мкг/см<sup>3</sup>) рассчитывали по формуле (3)

$$C_{PP} = \frac{C_{CO/PP} \cdot V_{CO/PP}}{V_{общ.}} \cdot 1000 \quad (3)$$

где  $C_{CO/PP}$  – массовая концентрация СИТ раствора, использованного для приготовления, мкг/см<sup>3</sup>;

$V_{CO/PP}$  – объем аликвоты раствора, использованного для приготовления, см<sup>3</sup>;

$V_{общ.}$  – общий объем раствора с аликвотой раствора, использованного для приготовления, и растворителя, см<sup>3</sup>.

Границы погрешности приготовления рабочих растворов с массовыми концентрациями СИТ в рабочем растворе (номера растворов 2, 3, 4, 5 и 6 по табл. 2) при доверительной вероятности  $P=0,95$  (без учета знака) ( $\Delta C_{PP}$ , мкг/см<sup>3</sup>) рассчитывали по формуле (4)

$$\Delta C_{PP} = C_{PP} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta C_{CO/p-pa}}{C_{CO/p-pa}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{CO}}{V_{CO}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{общ.}}{V_{общ.}}\right)^2}, \quad (4)$$

где  $\Delta V_{CO}$  – пределы допускаемой абсолютной погрешности дозатора одноканального (объем дозирования от 100 до 1 000 мм<sup>3</sup>), мм<sup>3</sup>;

$\Delta V_{общ.}$  – пределы допускаемой абсолютной погрешности дозатора одноканального (объем дозирования от 2 500 до 25 000 мм<sup>3</sup>), мм<sup>3</sup>;

$\Delta V_{CO/p-pa}$  – пределы допускаемой абсолютной погрешности раствора, использованного для приготовления, при доверительной вероятности  $P=0,95$ , мкг/см<sup>3</sup>.

Расчет массовой концентрации СИТ в рабочих растворах №№ 2–6 приведен в табл. 5.

#### Приготовление проб, загрязненных СИТ

В пять пронумерованных центрифужных пробирок вместимостью 15 см<sup>3</sup> отбирали навески рабочих проб массой  $(1,00 \pm 0,01)$  г, затем вводили добавку СИТ путем добавления аликвоты рабочих растворов № 5 и № 6, приготовленных по табл. 4.

При этом массовую долю СИТ в пробе с добавкой ( $C_{доб.}$ , мкг/кг (ppb)), рассчитывали по формуле (5)

$$C_{доб.} = \frac{C_{PP} \cdot V_{PP}}{m_{общ.}} \cdot 1000, \quad (5)$$

где  $C_{PP}$  – массовая концентрация СИТ в рабочем растворе (по табл. 5), вводимом в пробу в качестве добавки, мкг/см<sup>3</sup>;

$m_{общ.}$  – общая масса пробы с введенной добавкой, г;  
 $V_{PP}$  – объем аликвоты рабочего раствора СИТ (по табл. 6), вводимого в пробу в качестве добавки, см<sup>3</sup>.

Границы погрешности добавки при доверительной вероятности  $P=0,95$  (без учета знака) ( $\Delta C_{дон.}$ , мкг/кг (ppb)) рассчитывали по формуле (6)

$$\Delta C_{доб.} = C_{доб.} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta C_{PP}}{C_{PP}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{PP}}{V_{PP}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta m_{общ.}}{m_{общ.}}\right)^2}, \quad (6)$$

где  $C_{дон.}$  – массовая доля СИТ в пробе с добавкой, мкг/кг (ppb);

$\Delta C_{PP}$  – пределы допускаемой погрешности приготовления рабочего раствора СИТ (по табл. 2), вводимого в пробу в качестве добавки, мкг/см<sup>3</sup>;

$\Delta V_{PP}$  – пределы допускаемой погрешности дозатора одноканального (объем дозирования от 5 до 100 мм<sup>3</sup>; от 100 до 1 000 мм<sup>3</sup>), см<sup>3</sup>;

$\Delta m_{общ.}$  – пределы допускаемой погрешности весов лабораторных I (специального) класса точности по ГОСТ OIML R76–1 при нагрузке  $m$ , г.

Расчеты массовой доли СИТ в рабочих пробах с добавкой представлены в табл. 6.

Показатели точности методики измерений (повторяемость, воспроизводимость, правильность и погрешность в относительной форме) были оценены в ходе межлабораторного эксперимента с участием 5 лабораторий,

Таблица 5. Приготовление рабочих растворов №№ 2–6

Table 5. Preparation of working solutions No. 2–6

№ раствора, использованного для приготовления	№ приготовленного рабочего раствора	$V_{PP}$ , мм <sup>3</sup>	$V_{p-ля}$ , мм <sup>3</sup>	$C_{PP}$ , мкг/см <sup>3</sup>	$\delta C_{PP}$ , %
Стандартный раствор № 1	PP № 2	0,50	9,50	10,00	8,39
PP № 2	PP № 1	0,60	4,40	1,2	8,19
PP № 3	PP № 2	0,50	4,50	0,12	8,18
PP № 4	PP № 5	0,50	4,50	0,012	8,18
PP № 5	PP № 6	0,50	4,50	0,0012	8,18

Таблица 6. Приготовление проб с добавкой рабочих растворов № 5 и № 6, приготовленных по табл. 4  
Table 6. Preparation of samples with the addition of working solutions No. 5 and No. 6 prepared according to Table 4

Наименование измеряемой величины	№ РР, вводимого в пробу в качестве добавки	$C_{PP}$ , мкг/см <sup>3</sup>	$V_{PP}$ , см <sup>3</sup>	$C_{доб}$ , мкг/кг (ppb)	$\delta C_{доб}$ , %
Массовая доля СИТ	РР № 6	0,012	0,35	<b>3,11</b>	8,42
	РР № 5	0,12	0,09	<b>9,91</b>	8,54
		0,12	0,15	<b>15,65</b>	8,51
		0,12	0,23	<b>22,44</b>	8,47

организованного в 2022 г. Для проведения эксперимента были использованы 34 образца продуктов, перечисленных выше. Результаты измерений межлабораторного эксперимента массовой доли СИТ на примере проб двух продуктов, полученные лабораториями, представлены на рис. 8 и 9.

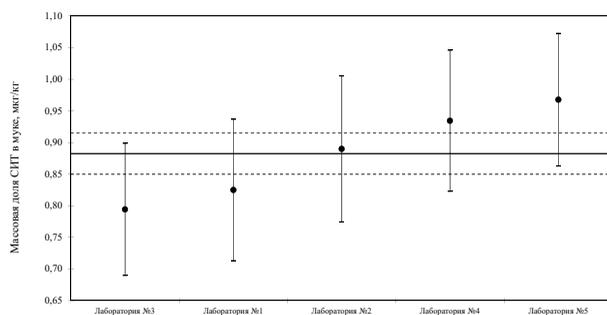


Рис. 8. Результаты межлабораторного эксперимента на примере продукта «Мука гречневая»

Fig. 8. The results of an interlaboratory experiment based on the example of the product «Buckwheat flour»

По результатам проведенных экспериментов был проведен расчет метрологических характеристик по формулам в соответствии с РМГ 61–2010, результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7. Значения показателей точности, правильности, повторяемости и воспроизводимости методики измерений массовой доли СИТ

Table 7. The values of indicators of accuracy, correctness, repeatability, and reproducibility of the method for measuring the mass fraction of STI

Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_{R0}$ , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости единичного результата измерений), $\sigma_{R0}$ , %	Показатель правильности (границы относительной неисключенной систематической погрешности измерений при доверительной вероятности $P=0,95$ ), $\pm \delta_c$ , %	Показатель точности (границы относительной погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$ ), $\pm \delta$ , %
13	18	19	40

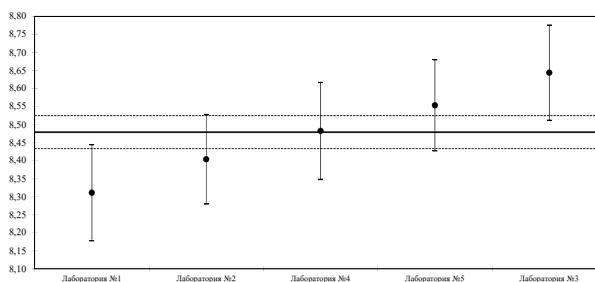


Рис. 9. Результаты межлабораторного эксперимента на примере продукта «Фарш куриный из филе грудки»

Fig. 9. The results of an interlaboratory experiment based on the example of the product «Chicken minced breast fillet»

## Закключение

Одной из главных особенностей разработки и аттестации методики измерений была оптимизация факторов, которые влияют на результаты измерений. При этом были изучены процессы, которые происходят при постановке метода ИФА, проведен анализ влияния каждого из них на точность результатов как экспериментальным путем, так и с учетом литературных данных.

В ходе исследования была разработана и аттестована методика измерений массовой доли соевого ингибитора

трипсина с применением иммуноферментного анализа в пищевых продуктах. Диапазон измерений составляет от 0,5 до 25,0 мкг/кг (ppb), предел обнаружения 0,1 мкг/кг (ppb), относительная погрешность 40%. При разработке методики была проведена оптимизация основных методических факторов, которые влияют на точность результатов измерений, таких как масса пробы, время ее экстракции, время и скорость центрифугирования пробы, соотношение надосадочной жидкости и ИФА-буфера, температура инкубации, время взаимодействия комплекса «антитело – аллерген» с окрашивающим агентом, длина волны для измерения оптической плотности и максимальное время для измерения оптической плотности после введения стоп-реагента.

Разработанная методика была апробирована в рамках межлабораторного эксперимента с участием 5 лабораторий. Методика успешно внедрена в работу этих лабораторий, а также во ФГАНУ «Научно-исследовательский институт хлебопекарной промышленности». Экспериментально установлено, что разработанная методика проста, экспрессна и дает надежные результаты при определении массовой доли соевого ингибитора трипсина в пищевых продуктах.

На основе экспериментальных результатов были рассчитаны метрологические характеристики в соответствии с РМГ 61–2010. Разработанная методика измерений аттестована на соответствие требованиям ГОСТ Р 8.563–2009, Федерального закона № 102-ФЗ, Приказу Минпромторга № 4091. Методика идентификации и количественного определения содержания неинфекционных пищевых аллергенов белкового растительного происхождения в пробах всех видов пищевых продуктов и объектов, связанных с требованиями к пищевой продукции, смывов, отбираемых с рабочих поверхностей при проведении производственного контроля, с помощью наборов реагентов для иммуноферментного анализа производства ООО «ХЕМА» зарегистрирована в ФИФ ОЕИ № ФР.1.31.2022.43884.

Практическая значимость полученных результатов заключается в возможности применения разработанной методики в испытательных лабораториях, которые занимаются контролем качества и безопасности выпускаемой продукции, а также может быть использована

для подтверждения соответствия продукции обязательным требованиям, установленным в ТР ТС 022/2012.

Перспективным направлением исследований в данной области является разработка стандартизированной методики измерений массовой доли соевого ингибитора трипсина методом ИФА и разработки стандартного образца с аттестованным значением массовой доли СИТ.

**Благодарности:** Это исследование не получало финансовой поддержки в виде гранта от какой-либо организации государственного, коммерческого или некоммерческого сектора.

**Acknowledgments:** This research did not receive financial support in the form of a grant from any governmental, for-profit, or non-profit organization.

**Вклад соавторов:** Первухина О. Е. – разработка замысла исследования, проведение исследовательских работ, написание черного варианта статьи, подготовка визуальных материалов; Крашенинина М. П. – разработка замысла исследования, курирование исследовательской деятельности, проверка и редакция текста статьи, утверждение окончательного варианта статьи; Петухов П. А. – разработка концепции исследования, разработка методик, предоставление материалов для исследования, утверждение окончательного варианта статьи; Майгурова В. Н. – проведение исследовательских работ, валидация.

**Contribution of the authors:** Olesya E. Pervukhina – development of the research concept, research work, writing a draft of the article, preparation of visual materials; Maria P. Krasheninina – development of the research concept, supervision of research activities, revision of the text, approval of the final version of the article; Pavel A. Petukhov – development of the research concept, development of methods, provision of materials for the study, approval of the final version of the article; Valentina N. Maigurova – research work, validation.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Jiang X., Jackson L. S. Food allergens // Encyclopedia of Food Safety (Second edition). Academic Press, 2024. P. 295–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00233-1>
2. Намазова-Баранова Л. С. Аллергия у детей: от теории к практике. М.: Союз педиатров России. 2010–2011. 668 с.
3. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy / A. Muraro [et al.] // Allergy. 2014. Vol. 69, № 8. P. 1008–1025. <https://doi.org/10.1111/all.12429>

4. Пищевая аллергия / А. А. Баранов [и др.]. М.: Педиатр, 2013. Сер. Болезни детского возраста от А до Я.
5. Prescott S., Allen K. J. Food allergy: riding the second wave of allergy epidemic // *Pediatric Allergy and Immunology*. 2011. Vol. 22, № 1. P. 156–160. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01145.x>
6. Codex Alimentarius: International food standards. Code of practice on food allergen management for food business operators CXC80–2020 Adopted in 2020.
7. Kerezsi A. D., Jacquet N., Blecker Ch. Advances on physical treatments for soy allergens reduction – A review // *Trends in Food Science & Technology*. 2022. Vol. 122. P. 24–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.007>
8. L'Hocine L., Boye Jo. I. Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007. Vol. 47, № 2. P. 127–43. <https://doi.org/10.1080/10408390600626487>
9. Пищевая аллергия: Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации. М.: Союз педиатров России, 2018. 50 с.
10. Vagadia B. H., Vanga S. K., Raghavan V. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – a review // *Trends in Food Science & Technology*. 2017. Vol. 64. P. 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.003>
11. Stability of the allergenic soybean Kunitz trypsin inhibitor / R. Roychaudhuri [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2004. Vol. 1699, Iss. 1–2. P. 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.02.014>
12. Comparison of physicochemical properties of recombinant buckwheat trypsin inhibitor (rBTI) and soybean trypsin inhibitor (SBTI) / Ch. Li [et al.] // *Protein Expression and Purification*. 2020. Vol. 171. P. 105614. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105614>
13. Recent advances and challenges in food-borne allergen detection / A. Sena-Torralba [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020. Vol. 132. P. 116050. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116050>
14. Sensitive detection of soy (glycine max) by real-time polymerase chain reaction targeting the mitochondrial atpA Gene / T. Bauer [et al.] // *AOAC International*. 2011. Vol. 94, Iss. 6. P. 1863–1873. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-257>
15. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food / A. M. Gomez [et al.] // *Food Chemistry*. 2011. Vol. 127, Iss. 2. P. 834–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.019>
16. Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens / M. Prado [et al.] // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016. Vol. 56, № 15. P. 2511–2542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.873767>
17. Development and validation of a specific sandwich ELISA for determination of soybean allergens and its application in processed foods / L. Zhu [et al.] // *Process Biochemistry*. 2022. Vol. 117. P. 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.022>
18. Determination of egg and milk allergen in food products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on signature peptides and isotope-labeled internal standard / S. Fan [et al.] // *Food Science and Human Wellness*. 2023. Vol. 12, Iss. 3. P. 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.09.006>
19. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review / X. Pei [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. 2013. Vol. 758, Iss. 3. P. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.060>
20. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) / L. Asensio [et al.] // *Food Control*. 2008. Vol. 19, Iss. 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.010>
21. О разработке метрологического обеспечения идентификации и количественного определения содержания неинфекционных пищевых аллергенов белкового животного или растительного происхождения в пищевых продуктах / О. Е. Первухина [и др.] // Эталон. Стандартные образцы. 2023. Т. 19, № 3. С. 145–158. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-145-158>
22. Первухина О. Е., Крашенинина М. П. Разработка стандартных образцов состава муки соевой и изолята соевого с аттестованными характеристиками массовой доли соевого ингибитора трипсина и массовой доли азота (белка) // За нами будущее: сборник тезисов докладов II Международной научно-практической конференции, Екатеринбург, 14–16 июня 2023 г. / Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии [и др.]. СПб: ООО «Издательско-полиграфическая компания «Коста», 2023. С. 80–86.

## REFERENCE

1. Jiang X., Jackson L. S. Food Allergens. *Encyclopedia of Food Safety (Second Edition)*. 2024:295–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00233-1>
2. Namazova-Baranova L. S. Allergy in children: from theory to practice. Moscow: Soiuz pediatrov Rossii; 2010–2011. 668 p. (In Russ.).
3. Muraro A., Werfel T., Hoffmann-Sommergruber K. et al. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014;69(8):1008–1025. <https://doi.org/10.1111/all.12429>
4. Baranov A. A., Namazova-Baranova L. S., Borovik T. E. et al. Food allergy. Iss. Bolezni detskogo vozrasta ot A do Ia. Moscow: Pедиатр; 2013. (In Russ.).
5. Prescott S., Allen K. J. Food allergy: riding the second wave of allergy epidemic. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2011;22(1):156–160. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2011.01145.x>
6. Codex Alimentarius: International food standards. Code of practice on food allergen management for food business operators CXC80–2020 Adopted in 2020.

7. Kerezsi A. D., Jacquet N., Blecker Ch. Advances on physical treatments for soy allergens reduction – A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;122:24–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.007>.
8. L'Hocine L., Boye Jo. I. Allergenicity of soybean: new developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007;47(2):127–43. <https://doi.org/10.1080/10408390600626487>.
9. Food allergy: clinical recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow: *Pediatr*; 2018. 50 p. (In Russ.).
10. Vagadia B. H., Vanga S. K., Raghavan V. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor – a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2017;64:115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.003>
11. Roychoudhuri R., Sarath G., Zeece M., Markwell Jo. Stability of the allergenic soybean Kunitz trypsin inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. Volume 2004;1699(1–2):207–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.02.014>.
12. Li Ch., Li W., Yi Zh., Simpson B. K. Comparison of physicochemical properties of recombinant buckwheat trypsin inhibitor (rBTI) and soybean trypsin inhibitor (SBTI). *Protein Expression and Purification*, 2020;171:105614. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105614>
13. Sena-Torralba A., Pallás-Tamarit Y., Morais S., Maquieira A. Recent advances and challenges in food-borne allergen detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020;132: 116050. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116050>
14. Bauer T., Kirschbaum K., Panter S., Kenk M., Bergemann J. Sensitive detection of soy (Glycine max) by real-time polymerase chain reaction targeting the mitochondrial atpA Gene. *AOAC International*. 2011;94(6):1863–1873. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.10-257>
15. Gomez Galan A. M., Brohé M., Silva E. de A., van Hengel A. J., Chassaigne H. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food. *Food Chemistry*. 2011;127(2):834–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.019>
16. Prado M., Ortea I., Vial S., Rivas J., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J. Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016;56(15):2511–2542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.873767>
17. Zhu L., Li S., Sun L. et al. Development and validation of a specific sandwich ELISA for determination of soybean allergens and its application in processed foods. *Process Biochemistry*. 2022;117:134–141. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.022>.
18. Fan S., Ma J., Liu Z. et al. Determination of egg and milk allergen in food products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on signature peptides and isotope-labeled internal standard. *Food Science and Human Wellness*. 2023;12(3):728–736. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.09.006>
19. Pei X., Zhang B., Tang J. et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2013;758(3):1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.060>
20. Asensio L., González I., García T., Martín R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*. 2008;19(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.010>
21. Pervukhina O. E. Sergeeva A. S., Krasheninina M. P. et al. On the development of metrological support for the identification and quantitative determination of the content of non-infectious food allergens of animal or plant protein origin in food products. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):145–158. (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/207711772023193-145-158>.
22. Pervukhina O. E., Krasheninina M. P. On the development of standard samples of soybean flour and soybean isolate composition with certified characteristics of mass fraction of soybean trypsin inhibitor and mass fraction of nitrogen (protein). In: *We are the future: Collection of works II international scientific conference*, 14–16 June 2023, Yekaterinburg. Federal Agency on Technical Regulating and Metrology et al., Kosta Publishing and Printing Company LLC; 2023. P. 80–86. (In Russ.).

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

ГОСТ 8.563–2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений = State system for ensuring the uniformity of measurements. Procedures of measurements. М.: Стандартинформ, 2011.

ГОСТ Р 58144–2018 Вода дистиллированная. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2022.

ГОСТ Р 55878–2013 Спирт этиловый технический гидролизный ректификованный. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2011.

РМГ 61–2010 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки = State system for ensuring the uniformity of measurements. Accuracy, trueness and precision measures of the procedures for quantitative chemical analysis. Methods of evaluation. М.: Стандартинформ, 2013.

Об обеспечении единства измерений: Федер. закон Рос. Федерации от 26 июня 2008 г. № 102–ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собрания Рос. Федерации 11 июня 2008 г.: одобрен Советом Федерации Федер. Собр. Рос. Федерации 18 июня 2008 г. (в редакции от 11 июня 2021 г. № 170-ФЗ) // Росс. газета. 2008. 2 июля.

Об утверждении Порядка аттестации первичных референтных методик (методов) измерений, референтных методик (методов) измерений и методик (методов) измерений и их применения: приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 15 декабря 2015 г. № 4091 // Официальный интернет-портал правовой информации. Дата опубликования: 26.02.2016. Номер опубликования: 0001201602260008.

ТР ТС 022/2011 Пищевая продукция в части ее маркировки: Технический регламент таможенного союза (с изменениями на 14 сентября 2018 года) // электронный фонд нормативно-технической и нормативно-правовой информации Консорциума «Кодекс» [сайт]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/902320347>

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Первухина Олеся Евгеньевна** – инженер лаборатории метрологии влагометрии и стандартных образцов УНИИМ – филиала ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»

620075, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4  
e-mail: [pervuhinaoe@uniim.ru](mailto:pervuhinaoe@uniim.ru)  
Researcher ID <https://www.researchid.co/rid69022>  
<https://orcid.org/0009-0004-7051-9833>

**Крашенинина Мария Павловна** – канд. техн. наук, ученый хранитель ГЭТ 173, ученый хранитель ГВЭТ 208–1, старший научный сотрудник лаборатории метрологии влагометрии и стандартных образцов УНИИМ – филиала ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»

Россия, 620075, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4  
e-mail: [krasheninina\\_m@uniim.ru](mailto:krasheninina_m@uniim.ru)  
Researcher ID: B-8302–2019  
<https://orcid.org/0000-0003-3691-1124>

**Петухов Павел Александрович** – директор по развитию ООО «ХЕМА»

Российская Федерация, 105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, 48,1  
e-mail: [onco.xema@gmail.ru](mailto:onco.xema@gmail.ru)

**Майгурова Валентина Николаевна** – менеджер клиентского сервиса ООО «ХЕМА»

Российская Федерация, 105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, 48,1  
e-mail: [onco.xema@gmail.ru](mailto:onco.xema@gmail.ru)

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Olesya E. Pervukhina** – Engineer of the Laboratory for Metrological Support of Moisture Measurement and Reference Materials, UNIIM – Affiliated Branch of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology

4 Krasnoarmeyskaya st., Yekaterinburg, 620075, Russia  
e-mail: [pervuhinaoe@uniim.ru](mailto:pervuhinaoe@uniim.ru)  
Researcher ID <https://www.researchid.co/rid69022>  
<https://orcid.org/0009-0004-7051-9833>

**Maria P. Krasheninina** – Cand. Sci. (Eng.), Assistant Scientific Custodian of GET 173, Scientific Custodian of GVET 208–1, Senior Researcher of the Laboratory for Metrological Support of Moisture Measurement and Reference Materials, UNIIM – Affiliated Branch of the D. I. Mendeleev Institute for Metrology

4 Krasnoarmeyskaya st., Yekaterinburg, 620075, Russia  
e-mail: [krasheninina\\_m@uniim.ru](mailto:krasheninina_m@uniim.ru)  
Researcher ID: B-8302–2019  
<https://orcid.org/0000-0003-3691-1124>

**Pavel A. Petukhov** – Development Director, XEMA LLC

48,1 Parkovaia st., Moscow, 105264, Russian Federation  
e-mail: [onco.xema@gmail.ru](mailto:onco.xema@gmail.ru)

**Valentina N. Maigurova** – Customer Service Manager, XEMA LLC

48,1 Parkovaia st., Moscow, 105264, Russian Federation  
e-mail: [onco.xema@gmail.ru](mailto:onco.xema@gmail.ru)