МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32196— 2013

ИЗДЕЛИЯ МАКАРОННЫЕ БЕЗГЛЮТЕНОВЫЕ

Иммуноферментный метод определения глютена

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Обществом с ограниченной ответственностью «Макарон-Сервис»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 июня 2013 г. № 57-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 31 октября 2013 г. № 1324-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32196—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2014 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины, определения и сокращения . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Условия проведения измерений . . . 2
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы . . . 2
7 Подготовка к проведению анализа . . . 3
8 Выполнение определения . . . 3
9 Обработка результатов . . . 4
10 Характеристики погрешности измерения . . . 4
11 Контроль погрешности результатов измерений . . . 4
Приложение А (справочное) Информация о проведенном межлабораторном эксперименте . . . 5
Библиография . . . 6

Введение

В соответствии с требованиями стандарта Codex Stan 118 Codex Standard for «gluten-free» foods и ALINORM 08/31/26, подготовленного Комитетом Кодекса Алиментариус по питанию и пищевым продуктам для специальных диет CCNFSD, продукты специализированного питания с пониженным содержанием глютена должны содержать 20—100 мг/кг глютена, а безглютеновые продукты питания не должны содержать более чем 20 мг/кг глютена и должны маркироваться как «безглютеновые» («gluten-free»). При этом содержание глютена напрямую зависит от содержания глиадина в изделиях.

Существуют два метода определения глиадина: изучение электрофоретического спектра и выявление токсичных глиадинов и иммуноферментный метод, в котором антитела R5, меченные пероксидазой, реагируют с фракциями белков зерновых культур, обладающих токсичностью, для населения с непереносимостью глютена, и в то же время не реагируют с другими белками зерновых культур или другими компонентами, содержащимися в пищевых продуктах или ингредиентах.

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ИЗДЕЛИЯ МАКАРОННЫЕ БЕЗГЛЮТЕНОВЫЕ

Иммуноферментный метод определения глютена

Gluten-free macaroni products. Enzyme immunoassay method for determination of gluten

Дата введения — 2014—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает иммуноферментный метод количественного определения глютена в безглютеновых макаронных изделиях.

Стандарт используется при контроле содержания глютена в безглютеновых макаронных изделиях в производственных и других лабораториях.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

ГОСТ 8.010[1)] Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений

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

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4403 Ткани для сит из шелковых и синтетических нитей. Общие технические условия

ГОСТ ИСО 5725-1[2)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ ИСО 5725-6[3)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6413 Кислота бензойная техническая. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 11773 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 18300[4)] Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 24104[5)] Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 31743 Изделия макаронные. Общие технические условия

[1)] В Российской Федерации по ГОСТ Р 8.563—2009 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений».

[2)] В Российской Федерации по ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002.

[3)] В Российской Федерации по ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002.

[4)] В Российской Федерации по ГОСТ Р 55878—2013 «Спирт этиловый технический гидролизный ректификованный. Технические условия».

[5)] В Российской Федерации по ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

Издание официальное

ГОСТ 31964 Изделия макаронные. Правила приемки и методы определения качества
СТ СЭВ 543 Числа. Правила записи и округления

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru казателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 8.010, ГОСТ ИСО 5725-1, ГОСТ 31964, ГОСТ 31743, [1].

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

- ИФА — иммуноферментный метод анализа;
- ТМБ — тетраметилбензидин.

4 Сущность метода

Метод основан на иммуноферментной реакции, в процессе которой меченные пероксидазой моноклональные антитела R5 к глиадину образуют химически прочный комплекс, который изменяет цвет продуктов химических реакций, с последующим измерением оптической плотности, характеризующей количество глиадина, с дальнейшим пересчетом на глютен.

5 Условия проведения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха — (20 ± 5) °С;
- влажность окружающего воздуха — не более 80 %.

Параметры источника питания — в соответствии с эксплуатационной документацией на фотометр.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы

Весы лабораторные с пределом допускаемой погрешности взвешивания ± 0,01 г по ГОСТ 24104.

Фотометр, предназначенный для считывания микролуночных стрипов, оснащенный фильтром 450 нм.

Пипетка одноканальная со сменным наконечником, позволяющая дозировать 10, 100, 1000 мм^3.

Пробирка коническая микроцентрифужная с крышкой типа Эппендорфа вместимостью 1,7 см^3.

Центрифуга с частотой вращения не менее 2400 об/мин.

Склянка промывная вместимостью 500 см^3.

Водоструйный насос по ГОСТ 25336.

Колбы мерные вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 1770.

Мельница лабораторная, позволяющая получить пробу для анализа с частицами требуемой крупности.

Сито лабораторное с размером отверстий 90 мкм по ГОСТ 4403.

Сито лабораторное с размером отверстий 250 мкм по ГОСТ 4403.

Спирт этиловый по ГОСТ 18300.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Испытательный комплект, состоящий:

- из планшета полистиролового, разделенного по лункам, с сорбированными анти-глиадин-антителами в комплекте с пленкой для заклеивания лунок;

- ИФА-буфера раствора для разбавления проб;
- калибровочных растворов глиадина концентрацией 0; 2; 10; 80 и 200 мкг/дм^3 для калибровки;
- концентрата промывочного раствора;
- раствора конъюгата антител к глиадину с пероксидазой;
- раствора субстрата — 3,3',5,5'-ТМБ;
- стоп-реагента — 5,0%-ного раствора серной кислоты по ГОСТ 4204.

Допускается использование другой аппаратуры и материалов, не уступающих перечисленным выше по метрологическим, техническим характеристикам, а также реактивов по качеству не ниже указанных.

Недопустимы разбавление или замена реактивов одного испытательного комплекта на реактивы из другого испытательного комплекта.

7 Подготовка к проведению анализа

7.1 Подготовка лабораторной пробы

Для приготовления лабораторной пробы в соответствии с ГОСТ 31964 отбирают 200—250 г макаронных изделий из суммарной пробы и измельчают на лабораторной мельнице.

Измельченную пробу просеивают через сита размером отверстий 90 и 250 мкм. Для проведения анализа отбирают проход с сита с размером отверстий 250 мкм и сход с сита с размером отверстий 90 мкм.

7.2 Приготовление раствора для экстракции

Растворы для экстракции и промывки готовят непосредственно перед их использованием.

Для приготовления раствора для экстракции смешивают 7 см^3 этилового спирта с 3 см^3 дистиллированной воды и перемешивают в мерной колбе.

7.3 Подготовка раствора экстракта

Из лабораторной пробы, подготовленной по 7.1, отбирают пробы для анализа массой (0,10 ± 0,01) г и переносят в пробирки Эппендорфа. В каждую пробирку с пробой для анализа добавляют 1 см^3 раствора для экстракции по 7.2, герметично их закрывают и проводят экстракцию в течение 30 мин при периодическом встряхивании. После этого полученную взвесь центрифугируют при 2400 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре до получения прозрачного слоя надосадочной жидкости (экстракта). Далее отбирают 20 мм^3 надосадочной жидкости, переносят в чистую пробирку Эппендорфа и разбавляют раствором для разбавления — ИФА-буфером 980 мм^3.

7.4 Приготовление промывочного раствора

Для приготовления промывочного раствора в мерной колбе разбавляют концентрат промывочного раствора, входящего в состав испытательного комплекта, в дистиллированной воде в соотношении 1 : 20.

8 Выполнение определения

В лунки планшета вносят по 100 мм^3 каждого калибровочного раствора глиадина концентрацией 0; 2; 10; 80 и 200 мкг/дм^3 и по 100 мм^3 разведенных по 7.3 экстрактов исследуемых проб.

Содержимое планшета перемешивают круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеивают планшет пленкой для заклеивания лунок и инкубируют в течение 30 мин. При этом растворенный глиадин (антиген) связывается с антителами, адсорбированными на поверхности лунок. Несвязанный материал удаляется последующей промывкой.

По окончании инкубации содержимое лунок аспирируют с помощью водоструйного насоса и промывают лунки три раза. При каждой промывке добавляют в каждую лунку по 250 мм^3 промывочного раствора по 7.4 и затем аспирируют с помощью водоструйного насоса. Далее во все лунки вносят по 100 мм^3 раствора конъюгата антител к глиадину с пероксидазой.

После чего заклеивают планшет пленкой для заклеивания и инкубируют его в течение 30 мин. При этом антитела коньюгата пероксидазы количественно связываются со связанным ранее глиадином.

По окончании инкубации содержимое лунок аспирируют с помощью водоструйного насоса. Далее лунки планшета промывают пять раз путем добавления во все лунки по 250 мм^3 промывочного раствора. После каждой промывки содержимое лунок аспирируют с помощью водоструйного насоса.

Далее во все лунки планшета вносят по 100 мм^3 раствора субстрата 3,3',5,5'-ТМБ. При этом пероксидаза коньюгата, связанного через глиадин и антитела с поверхностью лунки, окисляет субстрат ТМБ с образованием окрашенных в синий цвет продуктов.

Инкубируют планшет в темноте в течение 15 мин. Далее во все лунки планшета вносят 100 мм^3 стоп-реагента и перемешивают круговыми движениями по горизонтальной поверхности в течение 10 с. При этом процесс окрашивания останавливается, и окраска раствора меняется на желтую. Измерение оптической плотности проводят на фотометре в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Информация о проведенном межлабораторном эксперименте приведена в приложении А.

9 Обработка результатов

Для обработки результатов строят калибровочную кривую, которая представляет собой график кусочно-линейной зависимости оптической плотности калибровочных растворов от содержания глиадина: 0; 2; 10; 80 и 200 мкг/дм^3.

Содержание глиадина определяют по калибровочной кривой.

Содержание глютена в безглютеновых макаронных изделиях A, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$A = \frac{B \cdot 50 \cdot 10}{1000} \cdot 2, \qquad (1)$$

где B — концентрация глиадина в растворе, полученная по калибровочной кривой, мкг/дм^3;

50 — коэффициент разбавления экстракта;

10 — коэффициент разведения пробы, см^3/г;

1000 — коэффициент пересчета мкг/кг в мг/кг.

Вычисление проводят с точностью до целого числа, результат округляют до первого десятичного знака по СТ СЭВ 543.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений.

10 Характеристики погрешности измерения

Предел повторяемости — ± 10 %.

Предел воспроизводимости — ± 15 %.

Предел допускаемой относительной погрешности измерения — ± 20 %.

11 Контроль погрешности результатов измерений

Контроль погрешности результатов измерений рекомендуется проводить в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-6, [1], [2]. Процедуры контроля и их периодичность указывают в соответствующем руководстве по качеству или контракте на поставку продукции. Если такая периодичность не указана, то руководствуются рекомендациями [1] по выбору числа контрольных процедур в зависимости от объема анализируемых проб.

Приложение А
(справочное)

Информация о проведенном межлабораторном эксперименте

С целью аттестации метода, приведенного в настоящем стандарте, в испытательных лабораториях предприятий Российской Федерации, Республики Беларусь и Казахстана был организован межлабораторный эксперимент:

- количество лабораторий, принявших участие в эксперименте, — 8;
- количество проб, предоставленных в каждую из лабораторий, — 6.

Все результаты измерений, представленные лабораториями, были приняты в расчет метрологических характеристик методики измерений, изложенной в настоящем стандарте.

Измерения проведены с использованием испытательного комплекта Food Gliadin EIA:

- планшета (фирма Labsystems, Финляндия, кат. № 95029100) с сорбированными на внутренней поверхности лунок анти-глиадин-антителами (ООО «ХЕМА», Россия, кат. № А 380);
- калибровочных растворов: на основе фосфатного буфера (pH 7,2—7,4), содержащие 0; 2; 10; 80 и 200 мкг/дм^3 глиадина; 0,05 % натрия азид (фирма Serva, Германия, кат. № 30175), 0,02 г (раствор 0 мкг/дм^3 не содержит красителя) фенолового желтого (фирма Serva, Германия, кат. № 32093);
- конъюгата анти-глиадина — пероксидаза [мышиные моноклональные антитела к глиадину, конъюгированные с пероксидазой хрена (ООО «ХЕМА», Россия, кат. № Т 380), феноловый красный (фирма Serva, Германия, кат. № 32095)];
- раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) (фирма Neogen Corp., США, кат. № 300177);
- ИФА-Буфера: pH 7,0—7,2 объемом 50 см^3, содержащего 9,0 г натрия хлористого по ГОСТ 4233; 1,4 г натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного по ГОСТ 245; 0,8 г натрия фосфорнокислого двузамещенного 2-водного по ГОСТ 11773; 1,0 см^3 Твин-20 (фирма Merck, Германия, кат. № 822184); 3,0 г бычьего сывороточного альбумина (фирма Sigma, США, кат. № А 4503); 0,02 г бромфенолового синего (фирма Serva, Германия, кат. № 15376);
- концентрата промывочного раствора: 90 г натрия хлористого по ГОСТ 4233; 10 см^3 Твин-20 (фирма Merck, Германия, кат. № 822184); 0,02 см^3 кислоты бензойной по ГОСТ 6413; 21-кратного концентрата — один флакон (22 см^3);
- стоп-реагента — 5,0 % кислота серная по ГОСТ 4204;
- пленки с бумажной подложкой для заклеивания лунок (фирма Labsystems, Финляндия, кат. № 1541892).

Библиография

[1] РМГ 76—2004[1)] Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

[2] ISO 8258:1991[2)] Shewhart control charts (Карты контрольные Шухарта)

[1)] Заменен на РМГ 76—2014.

[2)] Заменен на ISO 7870-2:2013 «Карты контрольные. Часть 2. Контрольные карты Шухарта».

УДК 664.694:006.354 МКС 67.060

Ключевые слова: изделия макаронные безглютеновые, иммуноферментный метод, подготовка проб, глиадин, глютен, метрологические характеристики измерений

Редактор *Д.А. Кожемяк*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Д.В. Кардановской*

Сдано в набор 12.11.2019. Подписано в печать 21.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,85.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru stinfo.ru

gost.e-ecolog.ru