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
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Обществом с ограниченной ответственностью «Макарон-Сервис»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 003)

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

За принятие голосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 31664) 004-97	Код стран по МК (ИСО 31664) 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

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта опубликуется в указателе «Национальные стандарты»
Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также
в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

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

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 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 межгосударственные стандарты:

ГОСТ 8.010–99 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры,

ГОСТ 4204–77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4403–91 Ткани для сит из шелковых и синтетических нитей. Общие технические условия

ИСО 5725-1–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ИСО 5725-6–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6413–77 Кислота бензойная техническая. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 11773–76 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный. Техни-ческие условия

ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 31743–2012 Изделия макаронные. Общие технические условия

ГОСТ 31964–2012 Изделия макаронные. Правила приемки и методы определения качества

СТ СЭВ 543–77 Числа. Правила записи и округления

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

Издание официальное

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 8.010, 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.

Недопустимо 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 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 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа

[2] ИСО 8258–91 Статистические методы. 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

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,4. Тираж 31 экз. Зак. 795.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru