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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
33838—
2016

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЕРНА

Иммуноферментный метод определения глютена

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2016

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «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 (Росстандарт)
- 3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28.06.2016 г. № 49)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 сентября 2016 г. № 1244-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33838—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2018 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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 (www.gost.ru)

© Стандартиформ, 2016

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 Требования к условиям проведения измерений	2
6 Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, реактивам	2
7 Требования к квалификации операторов и безопасности	3
8 Подготовка к проведению определения	3
9 Порядок выполнения определения	4
10 Обработка и оформление результатов определений	4
11 Требования к показателям точности измерений	5
12 Контроль точности результатов измерений	6
Приложение А (справочное) Информация о проведенном межлабораторном эксперименте	7
Библиография	8

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЕРНА

Иммуноферментный метод определения глютена

Products of grain processing. Immunoassay method for the determination of gluten

Дата введения — 2018—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продукты переработки зерна (муку, крупу, отруби) и устанавливает иммуноферментный метод определения массовой доли (далее — содержания) глютена.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 8.010—2013 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения

ГОСТ 12.0.004—90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.019—79¹⁾ Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

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

ГОСТ ИСО 5725-2—2003²⁾ Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-6—2003³⁾ Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 10521—78 Реактивы. Кислота бензойная. Технические условия

ГОСТ 11773—76 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 18300—87⁴⁾ Спирт этиловый ректифицированный технический. Технические условия

¹⁾ В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

²⁾ В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002.

³⁾ В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

⁴⁾ В Российской Федерации действует ГОСТ Р 55878—2013 «Спирт этиловый технический гидролизный ректифицированный. Технические условия».

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ 26312.1—84 Крупа. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 27668—88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб

П р и м е ч а н и е — 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 по 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.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 8.010, ГОСТ ИСО 5725-2.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения:

- ИФА — иммуноферментный анализ;
- ТМБ — тетраметилбензидин.

4 Сущность метода

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

5 Требования к условиям проведения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С 20—25;
- влажность окружающего воздуха, %, не более 80.

6 Требования к средствам измерений, вспомогательному оборудованию, реактивам

6.1 При выполнении измерений по настоящему стандарту используют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы:

- весы неавтоматического действия I (специального) класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с действительной ценой деления 0,1 мг;
- фотометр для микропланшета, способный проводить измерения при длине волны 450 нм в диапазоне от 0 до 3,0 Б, с абсолютной погрешностью измерения оптической плотности $\pm 0,02$ Б;
- дозатор автоматический или механический одноканальный или многоканальный с возможностью дозирования 10—100 мм³ и 100—1000 мм³, с допуском относительным СКО не более 8,0 %;
- термостат суховоздушный или инкубатор, поддерживающий температуру от 20 °С до 98 °С, и способный поддерживать температуру (37 ± 2) °С;
- секундомер с допускаемой погрешностью при измерении интервала времени до 30 мин ± 3 с;
- пробирка коническая микроцентрифужная с крышкой типа Эппендорфа вместимостью 1,7 см³;
- центрифуга с частотой вращения не менее 2400 об/мин;
- склянка промывная вместимостью 500 см³;
- водоструйный насос по ГОСТ 25336;
- колбы 1-25-2, 1-250-2, 1-1000-2 по ГОСТ 1770;

- мельница лабораторная, позволяющая получить пробу для анализа с частицами требуемой крупности;
- сито лабораторное с размером отверстий 90 мкм из ткани по ГОСТ 4403;
- сито лабораторное с размером отверстий 250 мкм из ткани по ГОСТ 4403;
- спирт этиловый по ГОСТ 18300;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

6.2 При выполнении измерений по настоящему стандарту используют испытательный комплект, состоящий из:

- планшета полистиролового, разделенного по лункам, с сорбированными антиглиадин антителами в комплекте с пленкой для заклеивания лунок;
- ИФА-буфера раствора для разбавления проб;
- градуировочных растворов глиадина с концентрацией 0, 2, 10, 80 и 200 мкг/дм³;
- концентрата промывочного раствора;
- раствора конъюгата антител к глиадину с пероксидазой;
- раствора субстрата — 3,3',5,5'-ТМБ;
- стоп-реагента — 5,0 %-ного раствора кислоты серной по ГОСТ 4204.

6.3 Допускается использование других средств измерений и вспомогательного оборудования, не уступающих перечисленным выше по метрологическим и техническим характеристикам. Недопустимо разбавление или замена реактивов одного испытательного комплекта на реактивы из другого испытательного комплекта.

7 Требования к квалификации операторов и безопасности

7.1 К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное образование и опыт работы в химической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж, освоившего метод в процессе обучения и уложившегося в нормативы оперативного контроля при выполнении процедур контроля точности испытаний.

7.2 При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.0.004; требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004, ГОСТ 12.4.009 и электробезопасности при работе с электрооборудованием по ГОСТ 12.1.019.

8 Подготовка к проведению определения

8.1 Отбор проб

Отбор проб муки и отрубей — по ГОСТ 27668.

Отбор проб крупы — по ГОСТ 26312.1.

8.2 Подготовка лабораторной пробы

Для приготовления лабораторной пробы отобранную пробу 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.

П р и м е ч а н и е — Необходимо тщательно промывать устройства для измельчения при анализе нескольких продуктов для предотвращения перекрестной контаминации.

8.3 Приготовление раствора для экстракции

Растворы для экстракции и промывки готовят непосредственно перед их использованием.

Для приготовления раствора для экстракции смешивают 7 см³ этилового спирта с 3 см³ дистиллированной воды и перемешивают в колбе.

8.4 Подготовка раствора экстракта

Из лабораторной пробы, подготовленной по 8.2, отбирают две навески проб для анализа массой 0,10 г, взвешенных с точностью 10 мг, для проведения параллельных определений, и переносят в пробирки типа Эппендорф. В каждую пробирку с пробой для анализа добавляют 1 см³ раствора для экстракции по 8.3, герметично закрывают ее и проводят экстракцию в течение 30 мин при периодическом умеренном встряхивании. После этого полученную взвесь центрифугируют при 2400 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре до получения прозрачного слоя надосадочной жидкости (экстракта).

Одноканальным дозатором отбирают 20 мм³ надосадочной жидкости, переносят ее в чистую пробирку типа Эппендорф и добавляют 980 мм³ ИФА-буфера для разбавления проб.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение при комнатной температуре (от 20 °С до 25 °С) не более 12 ч.

8.5 Приготовление промывочного раствора

Промывочный раствор готовят непосредственно перед использованием. Для приготовления промывочного раствора в колбе разбавляют концентрат промывочного раствора, входящего в состав испытательного комплекта, в дистиллированной воде в соотношении 1:20.

8.6 Подготовка к проведению определений весов и фотометра

Подготовку средств измерений выполняют в соответствии с эксплуатационной документацией. Градуировочный график строят при каждом определении по разделу 9 и 10.1.

9 Порядок выполнения определения

9.1 В лунки планшета вносят по 100 мм³ каждого градуировочного раствора глиаина массовой концентрацией 0, 2, 10, 80 и 200 мкг/дм³. Экстракты анализируемой пробы, подготовленные по 8.4, в количестве 100 мм³ вносят в отдельные лунки. Содержимое планшета перемешивают круговыми движениями по горизонтальной поверхности.

9.2 Заклеивают поверхность планшета пленкой для заклеивания лунок и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 2) °С в течение 30 мин. По окончании инкубации жидкость из лунок удаляют с помощью водоструйного насоса. Лунки планшета промывают три раза, добавляя при этом в каждую лунку по 250 мм³ промывочного раствора, приготовленного по 8.5.

9.3 Далее во все лунки вносят по 100 мм³ раствора конъюгата антител к глиадину с пероксидазой. После этого заклеивают планшет пленкой для заклеивания и инкубируют его в течение 30 мин при температуре (37 ± 2) °С.

9.4 По окончании инкубирования содержимое лунок удаляют с помощью водоструйного насоса. Лунки планшета промывают пять раз, добавляя при этом в каждую лунку по 250 мм³ промывочного раствора, приготовленного по 8.5.

9.5 Далее во все лунки планшета вносят по 100 мм³ раствора субстрата 3,3',5,5'-ТМБ. Планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 5. Далее во все лунки планшета вносят 100 мм³ стоп-реагента и перемешивают круговыми движениями по горизонтальной поверхности в течение 10 с.

9.6 Измерение оптической плотности проводят с помощью фотометра при длине волны 450 нм в соответствии с эксплуатационной документацией сразу после внесения стоп-реагента, но не позднее, чем через 15 мин.

10 Обработка и оформление результатов определений

10.1 Для обработки результатов строят градуировочный график кусочно-линейной зависимости оптической плотности градуировочных растворов от содержания глиаина: 0; 2; 10; 80 и 200 мкг/дм³.

10.2 Расчет содержания глютенa в продуктах переработки зерна A , млн⁻¹, проводят по формуле

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

где A — содержание глютенa, млн⁻¹;

B — содержание глиаина в экстракте анализируемой пробы, полученное по градуировочному графику в соответствии с 10.1, мкг/дм³;

50 — коэффициент разбавления экстракта;

10 — коэффициент разведения пробы, см³/г;

1000 — коэффициент перевода микрограммов в миллиграммы;

2 — коэффициент пересчета с глиаина на глютен.

10.3 За окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений \bar{A} . Окончательный результат содержания глютенa округляют до целого числа.

Примечание — За параллельные определения содержания глютена принимают последовательно проведенные по разделу 8, 9 и рассчитанного по 10.2.

10.4 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6, проводят в следующем порядке.

Если расхождение между результатами параллельных измерений, полученными в условиях повторяемости, не превышает значения предела повторяемости r , за окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений.

Предел повторяемости r , %, рассчитывают по формуле

$$r = \sigma_r \cdot \bar{A} \cdot 0,01 \cdot 2,77, \quad (2)$$

где σ_r — показатель повторяемости в соответствии с таблицей 1, %;

\bar{A} — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, млн⁻¹.

Если абсолютное расхождение превышает предел повторяемости r , выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями раздела 9.

10.5 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-6, проводят в следующем порядке.

Проверку проводят при получении результатов измерений двумя лабораториями. Каждая лаборатория получает результаты двух последовательных измерений и проводит проверку их приемлемости по 10.4.

Совместимость окончательных результатов измерений, полученных двумя лабораториями, проверяют, сравнивая абсолютное расхождение между двумя средними результатами измерений с критической разностью $CD_{0,95}$:

$$CD_{0,95} = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}, \quad (3)$$

где r — предел повторяемости по формуле (2), %;

R — предел воспроизводимости, %, рассчитываемый по формуле

$$R = \sigma_R \cdot \bar{A} \cdot 0,01 \cdot 2,77, \quad (4)$$

где σ_R — показатель воспроизводимости в соответствии с таблицей 1, %;

\bar{A} — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, полученных в условиях воспроизводимости, млн⁻¹.

Если критическая разность превышена, то выполняют процедуры, изложенные в ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.3.3).

11 Требования к показателям точности измерений

11.1 Выполнение измерений по настоящему методу обеспечивает получение результатов измерений содержания глютена от 2 до 200 млн⁻¹ (мг/кг) с характеристиками относительной погрешности измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$, приведенными в таблице 1.

Т а б л и ц а 1 — Значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости

В процентах

Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R	Показатель точности (границы, в которых находится относительная погрешность измерения с вероятностью $P = 0,95$), δ
10	15	30

11.2 По мере накопления информации в процессе внутреннего контроля по настоящему методу измерений значения показателей точности, повторяемости и воспроизводимости могут быть уточнены с учетом фактически обеспечиваемых лабораторией значений с оформлением протокола по [1].

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Контроль точности результатов измерений — в соответствии с [1], ГОСТ ИСО 5725-6.

12.2 Контроль стабильности результатов измерений — в соответствии с положениями [1], [2].

12.3 Процедуры контроля и их периодичность указывают в Руководстве по качеству или в 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:

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

Пробы в межлабораторном эксперименте содержали следующее количество глиаина: 0; 2; 10; 80, 200 млн⁻¹ (мг/кг).

Все результаты измерений, представленные лабораториями, были приняты в расчет метрологических характеристик метода определения, изложенного в настоящем стандарте.

Т а б л и ц а А.1 — Результаты статистической обработки межлабораторного эксперимента

Параметр	Значение
Число лабораторий, принявших участие в эксперименте	8
Число проб, предоставленных в каждую из лабораторий	6
Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r , %	10
Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости) σ_R , %	15
Показатель точности (границы, в которых находится относительная погрешность измерения с вероятностью $P = 0,95$) δ , %	30

Измерения проведены с использованием испытательного комплекта Food Gliadin EIA:

- планшет¹⁾ с сорбированными на внутренней поверхности лунок антиглиадин-антителами²⁾;
- градуировочные растворы на основе фосфатного буфера (pH 7,2—7,4), содержащие 0; 2; 10; 80 и 200 мкг/дм³ глиаина; натрия азид³⁾, 0,05 %; феноловый желтый⁴⁾, 0,02 г (раствор 0 мкг/дм³ не содержит красителя);
- конъюгат антиглиадин — пероксидаза [мышинные моноклональные антитела к глиадину, конъюгированные с пероксидазой хрена⁵⁾, феноловый красный⁶⁾];
- раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)⁷⁾;
- ИФА-Буфер pH 7,0—7,2 объемом 50 см³, содержащий натрий хлористый по ГОСТ 4233, 9,0 г; натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный по ГОСТ 245, 1,4 г; натрий фосфорнокислый двухзамещенный 2-водный по ГОСТ 11773, 0,8 г; Твин-20⁸⁾, 1,0 см³; бычий сывороточный альбумин⁹⁾, 3,0 г; бромфеноловый синий¹⁰⁾, 0,02 г;
- концентрат промывочного раствора (21-кратный) объемом 22 см³, содержащий натрий хлористый по ГОСТ 4233, 9 г; Твин-20⁸⁾, 10 см³; кислоту бензойную по ГОСТ 10521, 0,02 см³;
- стоп-реагент — 5,0 %-ная кислота серная по ГОСТ 4204;
- пленка с бумажной подложкой для заклеивания лунок¹¹⁾.

1) Фирма Labsystems, Финляндия, кат. № 95029100.

2) ООО «ХЕМА», Россия, кат. № А 380.

3) Фирма Serva, Германия, кат. № 30175.

4) Фирма Serva, Германия, кат. № 32093.

5) ООО «ХЕМА», Россия, кат. № Т 380.

6) Фирма Serva, Германия, кат. № 32095.

7) Фирма «Neogen Corp.», США, кат. № 300177.

8) Фирма Merck, Германия, кат. № 822184.

9) Фирма Sigma, США, кат. № А 4503.

10) Фирма Serva, Германия, кат. № 15376.

11) Фирма «Labsystems», Финляндия, кат. № 1541892.

Данная информация приведена для удобства пользования настоящим стандартом и допускает использование другого оборудования с соответствующими характеристиками.

Библиография

- [1] РМГ 76—2014 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

Н39

Ключевые слова: продукты переработки зерна, иммуноферментный метод, подготовка проб, глиадин, глютен, метрологические характеристики измерений

Редактор *А.Э. Попова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 03.10.2016. Подписано в печать 07.10.2016. Формат 60 × 84¹/₈. Гарнитура Ариал.

Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,10. Тираж 37 экз. Зак. 2467.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru