ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 30024— 2012

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение активности фитазы

ISO 30024:2009
Animal feeding stuffs — Determination of phytase activity
(IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 004 «Комбикорма, белково-витаминно-минеральные концентраты, премиксы»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 августа 2012 г. № 222-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 30024:2009 «Корма для животных. Определение активности фитазы» (ISO 30024:2009 «Animal feeding stuffs — Determination of phytase activity»)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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 (gost.ru)

© Стандартинформ, 2014

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 Термины и определения . . . 1
3 Сущность метода . . . 1
4 Реактивы . . . 1
5 Оборудование . . . 3
6 Отбор проб . . . 3
7 Приготовление пробы . . . 3
8 Методика работы . . . 4
8.1 Растворы контрольной пробы . . . 4
8.2 Эталонные растворы . . . 4
8.3 Градуировочная кривая . . . 4
8.4 Контроль уровня фитазы . . . 4
8.5 Анализируемые пробы кормов . . . 6
9 Обработка результатов . . . 6
9.1 Градуировочная кривая . . . 6
9.2 Вычисление активности фитазы . . . 7
9.3 Поправка, учитывающая чистоту фитиновой кислоты и содержание воды . . . 8
9.4 Влияние контрольных значений . . . 8
10 Прецизионность . . . 8
10.1 Предел обнаружения и предел количественного определения . . . 8
10.2 Межлабораторное испытание . . . 9
10.3 Сходимость . . . 9
10.4 Воспроизводимость . . . 9
11 Протокол испытаний . . . 9
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных исследований . . . 10
Библиография . . . 11

Введение

Настоящий национальный стандарт был разработан с целью количественного определения активности фитазы в пробах кормов, с тем чтобы предоставить возможность контроля содержания фитазы в кормовых продуктах для животных.

Вместе с тем данный метод не допускается применять для оценки эффективности фитазы в живых организмах.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение активности фитазы

Animal feeding stuffs. Determination of phytase activity

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения активности фитазы в кормах.

Метод не позволяет отдельно идентифицировать фитазу, добавленную в качестве кормовой добавки.

Метод не применяют для оценки или сравнения эффективности фитазы в живых организмах.

Примечание — Метод разработан на основе имеющихся в настоящее время видов фитазы [Е1600 (КФ [1] 3.1.3.8, 3-фитаза), Е1614 (КФ 3.1.3.26, 4-фитаза) и Е1640 (КФ 3.1.3.26, 4-фитаза)].

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

2.1 **единица активности фитазы (ед.) [phytase unit (U)]:** Количество фермента, которое высвобождает 1 мкмоль неорганического фосфата из фитата за 1 мин в условиях реакций, установленных в настоящем стандарте.

3 Сущность метода

Фитаза высвобождает фосфат из субстрата *мио*-инозитолгексакисфосфата (фитата). Освободившийся неорганический фосфат определяют путем образования желтого комплекса с кислотным реактивом молибдата/ванадата. Оптическую плотность желтого комплекса измеряют при длине волны 415 нм, выделившийся неорганический фосфат количественно определяют при помощи градуировочной кривой, построенной на основе эталонных растворов фосфата.

4 Реактивы

В процессе анализа, если не указано иное, используют реактивы только признанной аналитической степени чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду, либо воду эквивалентной степени чистоты, не содержащую фосфатов.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Настоящий метод предусматривает использование опасных веществ. Следует соблюдать действующие нормы для потенциально опасных химических веществ с целью минимизации рисков для организационной, технической и личной безопасности.

[1] Классификация ферментов

Издание официальное

4.1 Аммиака раствор, с массовой долей 25 %, NH_3.

4.2 Аммония гептамолибдата тетрагидрат, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$.

4.3 Аммония монованадат, NH_4VO_3.

4.4 Кислота соляная, с массовой долей 25 %, HCl.

4.5 Кислота азотная, с массовой долей 65 %, HNO_3.

4.6 Калия дигидрофосфат, KH_2PO_4.

4.7 Фитат, фитиновой кислоты додеканатриевая соль, $C_6H_6Na_{12}O_{24}P_6 \cdot xH_2O$, из риса, Sigma® P0109[1)].

4.8 Натрия ацетата тригидрат, $CH_3COONa \cdot 3H_2O$.

4.9 Полисорбат 20[1)].

4.10 Разбавленная азотная кислота

Разбавляют один объем азотной кислоты с массовой долей 65 % (4.5) двумя объемами воды. Хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения не ограничен.

4.11 Реактив аммония гептамолибдат

Растворяют 100,0 г аммония гептамолибдата тетрагидрата (4.2) в 800 $см^3$ воды. Добавляют 10 $см^3$ раствора аммиака с массовой долей 25 % (4.1) и доводят объем водой до 1000 $см^3$. Хранят при комнатной температуре в темноте. Максимальный срок хранения — 2 мес.

4.12 Реактив аммония ванадат

Полностью растворяют 2,35 г аммония монованадата (4.3) в 400 $см^3$ воды при температуре от 50 °С до 60 °С. Добавляют 20 $см^3$ разбавленной азотной кислоты (4.10) и доводят объем водой до 1000 $см^3$. Хранят при комнатной температуре в темноте. Максимальный срок хранения — 2 мес.

4.13 Стоп-реагент молибдат/ванадат

Смешивают один объем реактива аммония ванадата (4.12) и один объем реактива аммония гептамолибдата (4.11) и добавляют два объема разбавленной азотной кислоты (4.10). Перемешивают и хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения — один день.

4.14 Полисорбат 20, с массовой долей 10 %

10,0 г полисорбата 20 (4.9) растворяют в воде и доводят объем водой до 100 $см^3$. Хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения — 6 мес.

4.15 Ацетатный буфер, pH 5,5, концентрацией 0,25 моль/$дм^3$

34,0 г натрия ацетата тригидрата (4.8) растворяют приблизительно в 900 $см^3$ воды. Доводят pH до 5,50 ± 0,02 при помощи раствора соляной кислоты с массовой долей 25 % (4.4) и доводят раствор водой до 1000 $см^3$. Хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения — две недели.

4.16 Ацетатный буфер с полисорбатом 20 с массовой долей 0,01 %, pH 5,5, концентрацией 0,25 моль/$дм^3$

34,0 г натрия ацетата тригидрата (4.8) растворяют приблизительно в 900 $см^3$ воды. Доводят pH до 5,50 ± 0,02 при помощи раствора соляной кислоты с массовой долей 25 % (4.4). Добавляют 1 $см^3$ раствора полисорбата 20 с массовой долей 10 % (4.14) и доводят объем водой до 1000 $см^3$. Хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения — две недели.

4.17 Ацетатный буфер с полисорбатом 20 с массовой долей 0,01 %, pH 5,5, концентрацией 0,50 моль/$дм^3$

68,0 г натрия ацетата тригидрата (4.8) растворяют приблизительно в 900 $см^3$ воды. Доводят pH до 5,50 ± 0,02 при помощи раствора соляной кислоты с массовой долей 25 % (4.4). Добавляют 1 $см^3$ раствора полисорбата 20 с массовой долей 10 % (4.14) и доводят объем водой до 1000 $см^3$. Хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения — две недели.

4.18 Раствор субстрата фитата, концентрацией 7,5 ммоль/$дм^3$ (конечная концентрация в реакции — 5 ммоль/$дм^3$)

2,00 г додеканатрия фитата (4.7), содержание неорганического фосфора в котором ≤0,1 % по массе (см. 9.3), растворяют приблизительно в 200 $см^3$ ацетатного буфера (4.15). Доводят pH до 5,50 ± 0,02 при помощи раствора соляной кислоты с массовой долей 25 % (4.4) и доводят раствор ацетатным буфером (4.15) до 250 $см^3$. Максимальный срок хранения — две недели при температуре 4 °С.

[1)] Это пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не накладывает обязательства применять данный продукт.

4.19 Исходный эталонный раствор фосфата, концентрацией 50 ммоль/дм^3

Высушивают приблизительно 10 г калия дигидрофосфата (4.6) при температуре 105 °С в течение 2 ч и помещают в эксикатор. Взвешивают приблизительно 682 мг высушенного калия дигидрофосфата, количественно переносят его в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до 100 см^3 ацетатным буфером концентрацией 0,25 моль/дм^3 с полисорбатом 20 с массовой долей 0,01 % (4.16). Рассчитывают точную концентрацию исходного эталонного раствора фосфата. Хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения — две недели.

4.20 Исходный эталонный раствор фитазы

Взвешивают от 100,0 до 300,0 мг образца фитазы, количественно переносят ее в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и растворяют в 100 см^3 ацетатного буфера концентрацией 0,25 моль/дм^3 с полисорбатом 20 с массовой долей 0,01 % (4.16). Перемешивают в течение 15—45 мин. Хранят при комнатной температуре. Максимальный срок хранения — один день.

5 Оборудование

Используют обычное лабораторное оборудование, в частности нижеприведенное.

5.1 Баня водяная, с регулируемой температурой (со вставными секциями для пробирок вместимостью 2 см^3).

5.2 pH-метр, с возможностью считывания показаний по меньшей мере до двух десятичных знаков.

5.3 Мешалки магнитные (мощностью ≥ 20 Вт).

5.4 Вертушки магнитные овальные (40 мм × 20 мм).

5.5 Весы аналитические, с возможностью считывания показаний как минимум до 0,1 мг.

5.6 Весы, с возможностью считывания показаний как минимум до 0,01 г.

5.7 Мешалка вихревая.

5.8 Центрифуга для микроцентрифужных пробирок (5.12), способная обеспечить ускорение от 11000g до 20000g.

5.9 Дозатор электронный.

5.10 Пипетки (электронные или ручные), способные отбирать объем в диапазоне от 0,01 до 2,00 см^3.

5.11 Спектрофотометр двухлучевой или планшет-ридер.

5.12 Пробирки микроцентрифужные вместимостью 2 см^3.

6 Отбор проб

В лабораторию необходимо доставить представительную пробу. Она не должна быть повреждена или изменена в процессе транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемая методика отбора проб приведена в [1].

7 Приготовление пробы

Для каждой пробы проводят два взвешивания.

Взвешивают две порции гранул или порошка, по 50 г каждой, в конических колбах вместимостью 500 см^3. Добавляют 500 см^3 воды и 0,5 см^3 раствора полисорбата 20 с массовой долей 10 % (4.14) к корму и интенсивно перемешивают в течение 45 мин на магнитной мешалке (5.3) с овальными вертушками (5.4). Переносят 2 см^3 экстракта корма в микроцентрифужную пробирку (5.12) и центрифугируют (5.8) в течение 3 мин при ускорении 11000g—20000g.

Неоднородность пробы может привести к высоким коэффициентам вариации (CV). Для проб корма, демонстрирующих CV > 15 %, эта неоднородность может возникать из-за неравномерного распределения частиц по размерам в продуктах при приготовлении кормов. Если пробы корма демонстрируют высокие коэффициенты вариации, пробы измельчают при помощи ультрацентробежной мельницы[1)], имеющей сито с номинальным размером отверстий 1 мм. Измельчают 150 г корма и экстрагируют, как это описано в данном пункте.

[1)] Это пример подходящего оборудования, имеющегося в продаже. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не содержит обязательств, накладываемых ИСО, применять данное оборудование.

8 Методика работы

8.1 Растворы контрольной пробы

Неорганический фосфат в пробе содействует формированию окраски. Таким образом, для каждой пробы предусмотрены растворы контрольной пробы. Для расчета активности фитазы контрольные значения вычитают из испытуемых значений.

8.2 Эталонные растворы

8.2.1 Эталонные растворы фосфата

Исходный эталонный раствор фосфата (4.19) разбавляют ацетатным буфером с концентрацией 0,25 моль/дм^3, содержащим полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16), в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Порядок проведения разбавлений с целью получения эталонных колориметрических растворов для построения кривой фосфата

Эталонный раствор	Количество объемов исходного эталонного раствора фосфата (4.19)	Количество объемов ацетатного буфера концентрацией 0,25 моль/дм^3, содержащего полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16)	Коэффициент разбавления	Концентрация, мкмоль/см^3 [a]
A	1	1	2	25
B	1	3	4	12,5
C	1	7	8	6,25
D	1	15	16	3,125
[a] Рассчитывают точные концентрации (4.19).				

8.2.2 Контроль уровня фитазы

В каждом случае, когда пробы выдерживают, предусмотрен контроль уровня фитазы. Исходный эталонный раствор фитазы (4.20) с известной активностью разбавляют до конечной активности 0,15—0,25 ед./см^3 и точную активность определяют согласно 8.4.

8.3 Градуировочная кривая

Проводят три определения для каждого разбавления фосфата и двух контрольных проб, результаты усредняют. Методика приведена в таблице 2.

В случае эталонных растворов фосфата отбирают пипеткой 0,360 см^3 ацетатного буфера концентрацией 0,25 моль/дм^3, содержащего полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16), в пробирку вместимостью 2 см^3 (5.12). Добавляют 0,04 см^3 эталонного раствора фосфата (таблица 1).

В случае контрольной пробы фосфата отбирают пипеткой 0,4 см^3 ацетатного буфера с концентрацией 0,25 моль/дм^3, содержащего полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16), в пробирку вместимостью 2 см^3 (5.12).

В обоих случаях добавляют 0,8 см^3 раствора субстрата фитата (4.18) и 0,8 см^3 стоп-реагента (4.13). Перемешивают содержимое пробирок и выдерживают их в течение 10 мин при комнатной температуре. Центрифугируют (5.8) пробирки в течение 3 мин при 11000—20000g и измеряют оптическую плотность прозрачной надосадочной жидкости при длине волны 415 нм, D (415).

Таблица 2 — Методика построения градуировочной кривой

Стадия анализа	Эталонный колориметрический раствор	Контрольная проба
Ацетатный буфер концентрацией 0,25 моль/дм^3, содержащий полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16)	0,360 см^3	0,400 см^3
Эталонный раствор фосфата (8.2.1)	0,04 см^3	0,00 см^3

Окончание таблицы 2

Стадия анализа	Эталонный колориметрический раствор	Контрольная проба
Раствор субстрата фитата (4.18)	0,8 $см^3$	0,8 $см^3$
Стоп-реагент (4.13)	0,8 $см^3$	0,8 $см^3$
Перемешивание	Да	Да
Комнатная температура	10 мин	10мин
Центрифугирование	3 мин при 11000—20000g	3 мин при 11000—20000g
Спектрофотометр (5.11)	415 нм (по сравнению с водой)	415 нм (по сравнению с водой)

8.4 Контроль уровня фитазы

Проводят три определения для каждого разбавления и двух контрольных проб, результаты усредняют. Методика приведена в таблице 3.

В случае определяемых растворов для контроля уровня фитазы, отбирают пипеткой 0,36 $см^3$ ацетатного буфера с концентрацией 0,25 моль/$дм^3$, содержащего полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16), в пробирку вместимостью 2 $см^3$ (5.12). Добавляют 0,04 $см^3$ разбавленного раствора для контроля уровня фитазы (8.2.2). Перемешивают пробу. Выдерживают растворы в течение 5 мин при температуре 37 °С. Добавляют 0,8 $см^3$ раствора субстрата фитата (4.18), предварительно нагретого до 37 °С. Выдерживают ровно 30 мин при температуре 37 °С. Через 30 мин добавляют 0,8 $см^3$ стоп-реагента (4.13) и перемешивают. Выдерживают растворы в течение 10 мин при комнатной температуре и затем центрифугируют их в течение 3 мин при 11000—20000g. Измеряют оптическую плотность $D(415)$ прозрачной надосадочной жидкости.

В случае растворов контрольных проб для контроля уровня фитазы, отбирают пипеткой 0,36 $см^3$ ацетатного буфера (4.15) в пробирку вместимостью 2 $см^3$ (5.12). Добавляют 0,04 $см^3$ разбавленного раствора для контроля уровня фитазы (8.2.2). Порядок добавления растворов отличается от порядка, используемого для определений. Выдерживают растворы контрольных проб в течение 5 мин при температуре 37 °С. Затем, в качестве стадии 1, добавляют стоп-реагент (4.13); в качестве стадии 2 добавляют раствор субстрата фитата (4.18), предварительно нагретый до 37 °С. Далее действуют в соответствии с таблицей 3, колонка 3, строка 9 и т. д.

Таблица 3 — Методика контроля уровня

Стадия анализа	Проба контроля уровня	Контрольная проба
Ацетатный буфер концентрацией 0,25 моль/$дм^3$, содержащий полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16)	0,36 $см^3$	0,36 $см^3$
Разбавленный раствор для контроля уровня фитазы (8.2.2)	0,04 $см^3$	0,04 $см^3$
Перемешивание	Да	Да
Предварительная выдержка при 37 °С	5 мин	5 мин
Раствор субстрата фитата (4.18) при 37 °С	0,8 $см^3$	0,8 $см^3$: стадия 2
Перемешивание	Нет	Нет
Выдержка при 37 °С	30 мин	Нет
Стоп-реагент (4.13)	0,8 $см^3$	0,8 $см^3$: стадия 1
Перемешивание	Да	Да
Комнатная температура	10 мин	10 мин
Центрифугирование	3 мин при 11000—20000g	3 мин при 11000—20000g
Спектрофотометр (5.11)	415 нм (по сравнению с водой)	415 нм (по сравнению с водой)

8.5 Анализируемые пробы кормов

Проводят три определения для каждого экстракта (см. раздел 7) и двух контрольных проб, результаты усредняют. Методика приведена в таблице 4.

При проведении анализа отбирают пипеткой 0,3 $см^3$ ацетатного буфера с концентрацией 0,25 моль/$дм^3$, содержащего полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16), в пробирку вместимостью 2 $см^3$ (5.12). Добавляют 0,1 $см^3$ экстракта корма (раздел 7) в качестве испытуемой пробы. Содержимое пробирки перемешивают. Предварительно выдерживают в течение 5 мин при температуре 37 °С. Добавляют 0,8 $см^3$ раствора субстрата фитата (4.18), предварительно нагретого до 37 °С. Выдерживают ровно 30 мин при 37 °С. Добавляют 0,8 $см^3$ стоп-реагента (4.13) и перемешивают. Выдерживают пробирку с ее содержимым в течение 10 мин при комнатной температуре и центрифугируют в течение 3 мин при 11000—20000g. Измеряют оптическую плотность $D(415)$ прозрачной надосадочной жидкости.

В случае растворов контрольных проб отбирают пипеткой 0,3 $см^3$ ацетатного буфера с концентрацией 0,25 моль/$дм^3$, содержащего полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16), в пробирку вместимостью 2 $см^3$ (5.12). Добавляют 0,1 $см^3$ экстракта корма (раздел 7). Порядок добавления растворов отличается от порядка, используемого для испытуемой пробы. Предварительно выдерживают контрольные пробы в течение 5 мин при 37 °С. Затем, в качестве стадии 1, добавляют стоп-реагент (4.13); в качестве стадии 2 добавляют раствор субстрата фитата (4.18), предварительно нагретый до 37 °С. Далее действуют в соответствии с таблицей 4, колонка 3, строка 9 и т. д.

Таблица 4 — Методика для испытуемых проб корма

Стадия анализа	Проба корма	Контрольная проба
Ацетатный буфер концентрацией 0,25 моль/$дм^3$, содержащий полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16)	0,3 $см^3$	0,3 $см^3$
Испытуемая проба[a]	0,1 $см^3$	0,1 $см^3$
Перемешивание	Да	Да
Предварительная выдержка при 37 °С	5 мин	5 мин
Раствор субстрата фитата (4.18) при 37 °С	0,8 $см^3$	0,8 $см^3$ (стадия 2)
Перемешивание	Нет	Нет
Выдержка при 37 °С	30 мин	Нет
Стоп-реагент (4.13)	0,8 $см^3$	0,8 $см^3$ (стадия 1)
Перемешивание	Да	Да
Комнатная температура	10 мин	10 мин
Центрифугирование	3 мин при 11000—20000g	3 мин при 11000—20000g
Спектрофотометр (5.11)	415 нм (по сравнению с водой)	415 нм (по сравнению с водой)

[a] Для испытания использовали испытуемые пробы с активностью не более 200 единиц активности фитазы на 1 кг корма, экстракт пробы 0,2 $см^3$ и 0,2 $см^3$ ацетатного буфера концентрацией 0,50 моль/$дм^3$, содержащего полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.17) (разбавление 1 к 2). Пробы с активностью более 2000 единиц активности фитазы на 1 кг корма необходимо надлежащим образом разбавить ацетатным буфером с концентрацией 0,25 моль/$дм^3$, содержащим полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16).

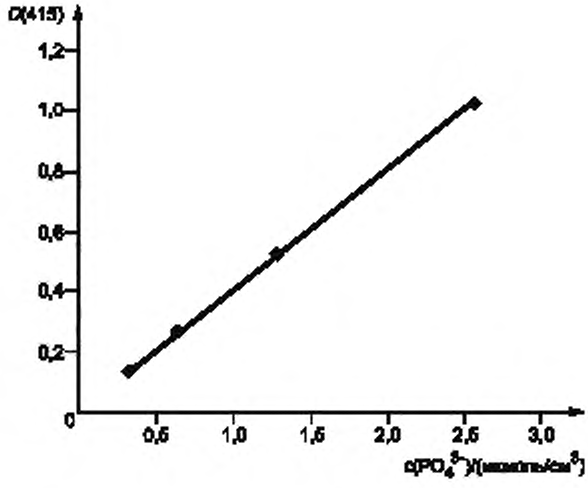
9 Обработка результатов

9.1 Градуировочная кривая

Строят градуировочную кривую с $\Delta D(415)$ [$D(415)_s$ — $D(415)_b$], где $D(415)_s$ и $D(415)_b$ — средние значения оптической плотности эталонных растворов и контрольной пробы соответственно, полученные с помощью эталонных растворов фосфата (8.2.1 и 8.3), на оси ординат и рассчитанными значениями концентрации фосфата — на оси абсцисс {в процессе расчета при разбавлении 1 к 10 в микроцентрифужной пробирке [0,04 $см^3$ разбавленного эталонного раствора (таблица 1) плюс 0,36 $см^3$ буфера] для реакции следует принять во внимание концентрацию фосфата в эталонном растворе}. Наиболее подходящую

линию рассчитывают с использованием линейной регрессии, $\Delta D(415) = kc(PO_4^{3-})$, (отрезок, отсекаемый на оси ординат, задают равным 0).

Пример приведен на рисунке 1.



D (415) — оптическая плотность при длине волны 415 нм;

D (415) = 0,4008 $c(PO_4^{3-})$;

c (PO_4^{3-}) — концентрация фосфата;

$r^2_{c(PO_4^{3-})D(415)}$ = 0,9996.

Рисунок 1 — Пример графика зависимости оптической плотности от концентрации фосфата эталонных колориметрических растворов, разбавленных ацетатным буфером с концентрацией 0,25 моль/дм^3, содержащим полисорбат 20 с массовой долей 0,01 % (4.16)

9.2 Вычисление активности фитазы

Активность фитазы a_p вычисляют по следующему уравнению:

$$a_p = \frac{\Delta D(415) V_d}{kmt}, \quad (1)$$

где $\Delta D(415)$ — фактическая оптическая плотность при длине волны 415 нм, рассчитанная из разности

$$D(415)_t - D(415)_b,$$

где $D(415)_t$ и $D(415)_b$ — средние значения оптической плотности анализируемой пробы и контрольной пробы (8.5) соответственно;

k — тангенс угла наклона градуировочной кривой, в обратных микромолях-миллилитрах, при $D(415)$;

V_d — объем, скорректированный для разбавления (объем экстракта, умноженный на разбавление экстракта), см^3;

m — масса пробы, г или кг;

t — время выдержки, мин.

Пример 1 — Контроль уровня фитазы

$\Delta D(415) = 0,216$.

$k = 0,3757$ мкмоль$^{-1}$ см^3.

V_d = 30000 см³ (100 см³ объема экстракта × 30 [разбавление 1 к 30 исходного эталонного раствора фитазы (4.20)] × 10 [0,04 см³ разбавленного исходного эталонного раствора фитазы (4.20) + 0,36 см³ буфера = 1 к 10]).

m = 0,1074 г.

t = 30 мин.

$$a_p = \frac{0{,}216 \times 30000}{0{,}3757 \times 0{,}1074 \times 30} = 5353 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ г}^{-1} = 5353 \text{ ед. г}^{-1}. \quad (2)$$

Пример 2 — Анализируемая проба корма

$\Delta D(415)$ = 0,183.

k = 0,3757 мкмоль$^{-1}$ см³.

V_d = 2000 см³ (500 см³ объема экстракта × 4 [0,1 см³ экстракта + 0,3 см³ буфера = 1 к 4]).

m = 0,050 кг.

t = 30 мин.

$$a_p = \frac{0{,}183 \times 2000}{0{,}3757 \times 0{,}050 \times 30} = 650 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ кг}^{-1} = 650 \text{ ед. кг}^{-1}. \quad (3)$$

9.3 Поправка, учитывающая чистоту фитиновой кислоты и содержание воды

Чистоту фитиновой кислоты и содержание в ней воды варьируют в зависимости от партии и, таким образом, их необходимо включить в расчеты для приготовления субстрата.

***Пример — Фитиновой кислоты додеканатриевая соль (массовая доля неорганического фосфора 0,008 %)*[1)].**

Поправку рассчитывают по уравнению

$$\frac{c(\text{фитата}) \cdot M}{w_p(1 - w_{H_2O})}, \quad (4)$$

где M — молярная масса додеканатрия фитата, г/моль;

w_p — чистота додеканатрия фитата, выраженная в массовых долях;

w_{H_2O} — содержание воды в додеканатрия фитате, выраженное в массовых долях.

Если c (фитата) = 7,5 ммоль/дм³; M = 923,8 г/моль; w_p = 97 % и w_{H_2O} = 12,6 %, поправка составит 8,17 г/дм³.

9.4 Влияние контрольных значений

Высокое содержание, например монокальция фосфата [$Ca(H_2PO_4)_2$], в пробах кормов может привести к высоким значениям оптической плотности контрольной пробы [$D(415)_b$ > 1,6]. Некоторые спектрофотометры могут не иметь линейность при высоких значениях оптической плотности (близких к 2). Значения для фитазы, полученные для проб кормов с такими высокими контрольными значениями, следует интерпретировать с осторожностью, поскольку высокие значения оптической плотности могут привести к недооценке или переоценке содержания фитазы. Снижения значений оптической плотности можно добиться разбавлением экстракта корма в соотношении 1:2 или 1:4 по объему. Вместе с тем значения $\Delta D(415)$ должны быть больше 0,04.

10 Прецизионность

10.1 Предел обнаружения и предел количественного определения

В соответствии с номенклатурой ИЮПАК (ссылка [2]) предел обнаружения определяют как $L_D = 3s$ и предел количественного определения — как $L_Q = 10\ \delta$, где s и δ — расчетное и абсолютное средние квадратические отклонения, соответственно.

В случае $\Delta D(415)$ предел обнаружения рассчитывают по уравнению

$$L_D = 0{,}011\ \Delta D(415), \quad (5)$$

[1)] P0109, Sigma® Lot 057K0049 — пример подходящего продукта, имеющегося в продаже. Данная информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не содержит обязательств применять данный продукт.

или 20 ед./кг корма;

предел количественного определения рассчитывают по уравнению

$$L_Q = 0{,}036\ \Delta D(415), \qquad (6)$$

или 60 ед./кг корма.

10.2 Межлабораторное испытание

Значения, полученные на основе межлабораторного испытания, могут быть неприменимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от приведенных.

10.3 Сходимость

Коэффициент вариации сходимости CV(r) — среднее значение коэффициента вариации двух независимых результатов, полученных на основе одной пробы, в тот же день, одним и тем же оператором, с применением одного и того же оборудования и метода.

Расчетный коэффициент вариации сходимости $\overline{CV}(r)$ равен 10 %.

10.4 Воспроизводимость

Коэффициент вариации воспроизводимости CV(R) — среднее значение коэффициента вариации результатов, полученных на основе одной пробы при использовании одного и того же метода, но в разных лабораториях, в различные дни, с применением различного оборудования и при участии разных операторов.

Расчетный коэффициент вариации воспроизводимости $\overline{CV}(R)$ равен 12 %.

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) используемый метод отбора проб, если он известен;

c) используемый метод испытаний со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все подробности проведения испытаний, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые в качестве альтернативных, вместе с информацией о любых факторах, которые могли повлиять на результаты;

e) полученные результаты испытаний;

f) в случае проверки сходимости — окончательные полученные результаты.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных исследований

Международное совместное испытание (см. [3]) с участием 14 лабораторий шести стран (шести Национальных испытательных лабораторий [Австрии, Дании, Франции, Германии (2), Венгрии], одной вне зоны Европейского союза — Агентства по контролю за качеством пищевых продуктов (Оттава, Канада), двух частных лабораторий во Франции и Швейцарии и пяти лабораторий компаний), проводилось с использованием пяти (жидких и твердых) проб корма. Данные пробы представляли собой комбикорм, состоящий из типичных компонентов с применением распространенного рецепта, обогащенный ферментом фитаза из различных источников и в различной форме, т. е. фитаза была произведена различными компаниями и была добавлена как в твердой, так и в жидкой форме.

Были проанализированы восемь проб корма (А—Н), каждая из которых содержала один из четырех различных видов фитазы, в жидком и твердом виде. Каждый материал был проанализирован в анонимных дубликатах.

Данные прецизионности для метода, приведенного в [3], представлены в таблице А.1. Данные прецизионности (10.3 и 10.4) рассчитаны на основе итоговых результатов исследования, приведенных в [3].

Таблица А.1 — Данные прецизионности для метода

Параметр	Жидкий продукт 1 500 ед./кг, А	Жидкий продукт 2 750 ед./кг, В	Жидкий продукт 3 1000 ед./кг, С	Жидкий продукт 4 1250 ед./кг, D	Твердый продукт 1 1500 ед./кг, Е	Твердый продукт 2 1500 ед./кг, F	Твердый продукт 3 1500 ед./кг, G	Твердый продукт 4 1500 ед./кг, Н
Среднее значение, ед./кг	519	726	772	1219	1498	1621	1364	1199
Число лабораторий с резко отклоняющимися значениями	0	3	1	0	0	2	2	2
Число лабораторий после исключения лабораторий с резко отклоняющимися значениями, n	14	11	13	14	14	12	12	12
Среднее квадратичное отклонение сходимости, s_r, ед./кг	43	43	62	88	159	164	119	26
Коэффициент вариации сходимости, CV(r), %	8,3	6,0	8,0	7,2	10,6	10,1	8,8	2,2
Среднее квадратичное отклонение межлабораторной воспроизводимости, s_{ir}, ед./кг	66	51	89	127	164	164	131	39
Коэффициент вариации межлабораторной воспроизводимости, CV(ir), %	12,7	7,0	11,5	10,4	11,0	10,1	9,6	3,3
Среднее квадратичное отклонение воспроизводимости, s_R, ед./кг	78	59	115	155	182	164	153	65
Коэффициент вариации воспроизводимости, CV(R), %	15,0	8,1	14,9	12,8	12,2	10,1	11,2	5,4

Библиография

[1] ИСО 6497, Корма для животных. Отбор проб[1)]

[2] CURRIE, L.A. for the IUPAC ANALYTICAL CHEMISTRY DIVISION COMMISSION ON ANALYTICAL NOMENCLATURE. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. Pure Appl. Chem. 1995, 67, pp. 1699—1723. Available (2009—01—19) at http://www.iupac.org/publications/pac/1995/pdf/6710x1699.pdf

[3] GIZZI, G., THYREGOD, P., VON HOLST, C., BERTIN, G., VOGEL, K., FAURSCHOU-ISAKSEN, M., BETZ, R., MURPHY, R., ANDERSEN, B.B. Determination of phytase activity in feed: Interlaboratory study. J. AOAC Int. 2008, 91, pp. 259—267

[1)] На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 6497—2011 «Корма для животных. Отбор проб».

УДК 637.11.001:006.354 ОКС 65.120 С19 ОКСТУ 9209 9709

Ключевые слова: корма, фитаза, активность фитазы, реактивы, отбор проб, эталонные растворы, неорганический фосфат, градуировочная кривая, вычисление активности фитазы, контроль уровня фитазы, анализируемая проба корма, предел обнаружения, предел количественного определения, прецизионность, сходимость, воспроизводимость, оптическая плотность при длине волны 415 нм

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *О.Н. Власова*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *Ю.В. Деменииной*

Сдано в набор 07.02.2014. Подписано в печать 24.02.2014. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 0,93. Тираж 123 экз. Зак. 303.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru @gostinfo.ru

gost.e-ecolog.ru