МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33428— 2015 (ISO 17180:2013)

КОРМА, ПРЕМИКСЫ

Определение содержания лизина, метионина и треонина

(ISO 17180:2013, Animal feeding stuffs — Determination of lysine, methionine and threonine in commercial amino acid products and premixtures, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

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 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Межгосударственным техническим комитетом по стандартизации МТК 4 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 августа 2015 г. № 79-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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 октября 2015 г. № 1445-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33428—2015 (ISO 17180:2013) введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ISO 17180:2013 «Корма для животных. Определение содержания лизина, метионина и треонина в коммерческих аминокислотных продуктах и премиксах» («Animal feeding stuffs — Determination of lysine, methionine and threonine in commercial amino acid products and premixtures», MOD) путем изменения его структуры для приведения в соответствие с правилами, установленными в ГОСТ 1.5 (подразделы 4.2 и 4.5).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 10 «Корма для животных» Технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Уточненные отдельные слова, фразы, абзацы внесены в текст межгосударственного стандарта для приведения в соответствие с отраслевой терминологией и выделены курсивом. Дополнительные примечания, разделы и таблица выделены полужирным курсивом.

В настоящем стандарте заменены единицы измерения объема «литр» на «дециметр кубический», «миллилитр» на «сантиметр кубический» для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5—2001 (пункт 4.14.1).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6).

В настоящем стандарте ссылки на международные стандарты, используемые в примененном международном стандарте, заменены на межгосударственные стандарты, гармонизированные с международными.

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта приведено в приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Май 2020 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»

© ISO, 2013 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2016, 2020

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 Сущность метода . . . 2
4 Оборудование . . . 2
5 Реактивы и материалы . . . 2
6 Приготовление растворов . . . 3
7 Отбор и подготовка проб . . . 4
8 Проведение испытания . . . 4
8.1 Количество испытаний . . . 4
8.2 Приготовление анализируемых растворов с использованием весового разведения . . . 4
8.3 Приготовление анализируемых растворов с использованием объемного разведения . . . 5
8.4 Хроматография . . . 5
9 Обработка результатов . . . 5
9.1 Градуировка и контроль стабильности градуировочной характеристики . . . 5
9.2 Вычисление результатов при весовом разведении . . . 6
9.3 Вычисление результатов при объемном разведении . . . 6
10 Прецизионность . . . 7
10.1 Межлабораторные испытания . . . 7
10.2 Повторяемость . . . 7
10.3 Воспроизводимость . . . 7
11 Протокол испытаний . . . 7
Приложение *А* (справочное) Данные совместных исследований . . . 8
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта . . . 10

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА, ПРЕМИКСЫ

Определение содержания лизина, метионина и треонина

Feeds, premixtures. Determination of lysine, methionine and threonine

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод количественного определения свободных (не входящих в состав белков) лизина, метионина и треонина *(далее — аминокислот)* в комбикормовой продукции и комбикормовом сырье, содержащих более 10 % массовой доли соответствующей аминокислоты.

Метод не позволяет различить *D*- и *L*-формы.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3652 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 13496.0 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

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

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

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.

Издание официальное

3 Сущность метода

Пробы обрабатывают раствором соляной кислоты, разбавляют цитратным буфером и добавляют внутренний стандарт норлейцина. Аминокислоты разделяют на аминокислотном анализаторе или высокоэффективной жидкостной хроматографией с использованием катионообменной смолы и цитратного буфера в качестве элюента, проводят дериватизацию нингидрином или ортофталдиальдегидом (OPA) и детектируют с помощью фотометрического или флуоресцентного детектора соответственно.

4 Оборудование

4.1 Стаканы *В(Н)—1(2)—100(250, 1000) ТХС по ГОСТ 25336.*

4.2 Колбы мерные *1(2)—50(100, 1000)—2 по ГОСТ 1770.*

4.3 Цилиндры мерные *1(2)—100(1000) по ГОСТ 1770.*

4.4 Пипетки градуированные *1(2, 3, 5)—1(1а, 2, 2а)—1—5(10) по ГОСТ 29227.*

4.5 Мешалка магнитная или блендер механический.

4.6 Фильтры мембранные из ацетата целлюлозы или PVDF *с размером пор* 0,2 мкм.

4.7 Дилютор для объемного разведения.

Если дериватизацию проводят с нингидрином, то используют разбавление в соотношении 1:20. Для OPA дериватизации используют более высокий коэффициент разбавления. Необходимо регулярно проверять коэффициент вариации CV при разведении; CV должен быть не менее 1 %.

4.8 pH-метр.

pH-метр или иономер с диапазоном измерений активности водородных ионов от 0 до 14 ед. pH и пределом допускаемой абсолютной погрешности измерения не более 0,05 ед. pH.

4.9 Весы *неавтоматического действия специального класса точности с пределами допускаемой погрешности не более ± 0,0005 г (100,0 ± 0,5) мг по ГОСТ R OIML 76-1.*

4.10 Анализатор аминокислотный или другое оборудование для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), включающее:

4.10.1 колонку с подготовленой катионнобменной смолой;

4.10.2 предколонку;

4.10.3 инжектор автоматический или ручной с объемом ввода от 10 до 100 мкдм^3;

4.10.4 ВЭЖХ-насосы для буферов;

4.10.5 *систему постколоночной дериватизации с нингидрином или OPA;*

4.10.6 УФ-детектор канальный, установленный на 440 и 570 нм для постколоночной дериватизации с нингидрином, или детектор флуоресцентный с длиной волны возбуждения 330 нм и длиной волны излучения 460 нм для постколоночной дериватизации с OPA;

4.10.7 систему регистрации и обработки данных.

4.11 Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема 10—100, 100—1000, 1000—5000 мм^3 по ГОСТ 28311.

4.12 Пробирки однократного применения (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см^3.

4.13 Сито с размером стороны ячейки 0,25 мм.

4.14 Мельница лабораторная или ступка.

4.15 Колбы Кн—1(2)—500—34/35 ТХС по ГОСТ 25336.

5 Реактивы и материалы

5.1 Вода бидистиллированная или эквивалентного качества (проводимость менее 10 *мкс*/см).

5.2 Стандарты *определяемых* аминокислот с массовой долей основного вещества не менее 99 %, высушенные под вакуумом в эксикаторе *над пятиокисью фосфора* P_2O_5 в течение двух дней перед использованием.

5.2.1 Лизин HCl кристаллический.

5.2.2 Треонин кристаллический.

5.2.3 Метионин кристаллический.

5.3 Норлейцин кристаллический для использования в качестве внутреннего стандарта с массовой долей основного вещества не менее 99 %, высушенный под вакуумом в эксикаторе над *пятиокисью фосфора* P_2O_5 в течение двух дней перед использованием.

5.4 Натрия *гидроокись по ГОСТ 4328.*

5.5 Кислота соляная *по ГОСТ 3118.*

5.6 Натрий лимоннокислый двуводный.

5.7 2,2′-Тиодитанол (тиодигликоль) *с содержанием основного вещества не менее 95,0 %.*

5.8 Фенол кристаллический с массовой долей основного вещества не менее 98,5 %.

5.9 Буферы элюирующие для катионнообменной колонки.

Используют имеющиеся в продаже готовые буферы или готовят их в соответствии с инструкцией к используемому анализатору. Обычно используют от трех до пяти буферных растворов, содержащих карбонат или цитрат натрия и небольшие количества добавок или консервантов.

5.10 Нингидрин или ОРА. Используют имеющиеся в продаже реактивы или готовят их в соответствии с инструкцией к используемому анализатору.

5.11 Оксид фосфора (V) с содержанием основного вещества не менее 98 %.

5.12 Кислота лимонная по ГОСТ 3652.

5.13 Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Примечание — Допускается использование реактивов аналогичной квалификации.

6 Приготовление растворов

6.1 Приготовление раствора гидроокиси натрия *молярной концентрации* 7,5 моль/*дм*^{3}

Гидроокись натрия массой 300,0 г растворяют в воде *(см. 5.1)* небольшими порциями при перемешивании и после охлаждения доводят *объем раствора водой до* 1000 см^3.

Срок хранения раствора не ограничен.

6.2 Приготовление раствора соляной кислоты *молярной концентрации* 0,1 моль/*дм*^{3}

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 (*см.* 4.3) помещают 8,2 *см*^{3} соляной кислоты (*см. 5.5*), добавляют около 900 *см*^{3} воды (*см. 5.1*), тщательно перемешивают и доводят водой (*см. 5.1*) *объем раствора до метки.*

Срок хранения раствора не ограничен.

6.3 Приготовление цитратного буфера 2,20 *ед.* pH

В стакан вместимостью 1000 см^3 *помещают* 19,61 г двуводного лимоннокислого натрия (*см. 5.6*), 1 г фенола (*см. 5.8*), 5 *см*^{3} тиодигликоля *(см. 5.7)*, 16,5 *см*^{3} соляной кислоты *(см. 5.5) и растворяют их в* 800 *см*^{3} бидистиллированной воды (фенол используют для сохранения буферного раствора). *Доводят* pH *раствора до* 2,20 *ед.* pH несколькими каплями *раствора* соляной кислоты *(см. 5.5)* или *раствора гидроокиси* натрия *(см. 6.1).*

Цитратный буфер может быть приготовлен из лимонной кислоты и хлорида натрия.

Срок хранения раствора при комнатной температуре в местах, защищенных от попадания прямых солнечных лучей, — 2 мес. При наличии в растворе помутнения и хлопьевидного осадка раствор следует заменить свежеприготовленным.

6.4 Приготовление стандартных растворов аминокислот

6.4.1 Приготовление основного раствора норлейцина *молярной концентрации* 2,5 ммоль/*дм*^{3}

В стакане вместимостью 100 (250) см^3 растворяют 0,328 г норлейцина (*см. 5.3*) *в растворе соляной кислоты* (*см. 6.2*), количественно переносят в мерную колбу *вместимостью 1000 см*^{3} и доводят объем до метки тем же раствором (*см. 6.2*).

Срок хранения раствора при температуре ниже 5 °С — не более 6 мес.

6.4.2 Приготовление основных растворов аминокислот *молярной концентрации 2,5 ммоль/дм*^{3}

Готовят основные растворы для каждой аминокислоты.

Основные растворы должны содержать только анализируемые аминокислоты, т. е. лизин, треонин, метионин. Не рекомендуется использовать имеющиеся в продаже готовые смеси, например содержащие 18 аминокислот, т. к. они дают большую погрешность определения.

В три мерные колбы вместимостью 1000 см^3 *помещают соответственно* 0,456 г лизина гидрохлорида (*см. 5.2.1*), 0,297 г треонина (*см. 5.2.2*), 0,373 г метионина (*см. 5.2.3*), доводят объем в колбах до метки раствором соляной кислоты (*см. 6.2*).

Срок хранения растворов при температуре ниже 5 °С — не более 6 мес.

6.4.3 Приготовление **градуировочных растворов аминокислот**

6.4.3.1 Весовое разведение

В колбы вместимостью 50 *см*^{3} взвешивают *(см. 4.9) по* 2,5 *см*^{3} основного раствора каждой аминокислоты m_{aa} *(см. 6.4.2)* и 2,5 *см*^{3} основного раствора норлейцина (m_{Nle}) (*см. 6.4.1*). Доводят объем *раствора в колбе* до метки цитратным буфером (*см. 6.3*).

Срок хранения раствора при температуре ниже 5 °С — не более 1 нед.

6.4.3.2 Объемное разведение

С помощью *пипеточного дозатора* (*см. 4.11*) или дилютора (*см.* 4.7) разбавляют равные объемы основных растворов аминокислот (*см. 6.4.2*) и основного раствора норлейцина (*см. 6.4.1*) цитратным буфером (*см. 6.3*). Например, 50 *мм*^{3} основного раствора норлейцина и 50 *мм*^{3} основного раствора аминокислоты разбавляют в пробирке *однократного применения (типа Эппендорф)* или дилюторе цитратным буфером до *1000 мм*^{3}.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

7.2 Подготовка проб

Пробу измельчают на лабораторной мельнице или в ступке (*см. 4.15*) до прохода через сито с размером стороны ячейки 0,25 мм (*см. 4.14*) и тщательно перемешивают.

8 Проведение испытания

8.1 Количество испытаний

Для каждой пробы проводят два параллельных испытания в условиях повторяемости.

8.2 Приготовление анализируемых растворов с использованием весового разведения

8.2.1 Приготовление анализируемых растворов аминокислот

Взвешивают 0,45—0,47 г лизина гидрохлорида, 0,29—0,31 г треонина и 0,36—0,38 г метионина. Навески переносят во взвешенные *конические* колбы (*см. 4.16*) *вместимостью* 500 см^3 и добавляют примерно по 400 см^3 раствора соляной кислоты (*см. 6.2*). *Колбы помещают* на магнитную мешалку *(см. 4.5) и* перемешивают содержимое в течение 30 мин. *Взвешивают колбы с растворами и вычисляют* массу экстракционного раствора m_{ex}.

С помощью *пипеточного дозатора (см. 4.12) берут* аликвоту 1 *см*^{3} в *предварительно взвешенную* мерную колбу вместимостью 50 *см*^{3} и определяют массу аликвоты m_{ali}. В ту же колбу *помещают* 2,5 *см*^{3} раствора норлейцина (*см. 6.4.1*), взвешивают колбу и вычисляют *его массу* $m_{Nle\ ts}$, затем доводят *объем раствора* до метки цитратным буфером (*см. 6.3*) и тщательно перемешивают.

Если приготовленный раствор не был проанализирован в день приготовления, то он должен храниться при температуре ниже 5 °С не более трех дней.

8.2.2 Приготовление анализируемых растворов премиксов и смесей аминокислот

Если в продукте ожидается низкое содержание аминокислот, то примерную массу навески продукта $m_{tp\ premix}$, г, вычисляют по формуле

$$m_{tp\ premix} = \frac{m_{tp\ pure\ aa} \cdot 100}{W_{exp}}, \quad (1)$$

где $m_{tp\ pure\ aa}$ — масса навески анализируемой аминокислоты, г;

100 — коэффициент пересчета из процентов;

W_{exp} — ожидаемое низкое значение массовой доли аминокислоты, %.

Например, для премикса с массовой долей DL-метионина 20 % требуется навеска в размере от 1,8 до 1,9 г.

Рассчитанные навески взвешивают в предварительно взвешенные *конические* колбы (*см. 4.16*) *вместимостью* 500 *см*^{3}. Добавляют примерно по 400 *см*^{3} *раствора соляной кислоты (см. 6.2). Колбы помещают* на магнитную мешалку *(см. 4.5) и* перемешивают содержимое в течение 30 мин. *Взвешивают колбы с растворами и вычисляют* массу экстракционного раствора m_{ex}.

С помощью *пипеточного дозатора (см. 4.12) берут* аликвоту 1 *см*^{3} в *предварительно взвешенную* мерную колбу вместимостью 50 *см*^{3} и определяют массу аликвоты m_{ali}. В ту же колбу *помещают* 2,5 *см*^{3} раствора норлейцина (*см. 6.4.1*), *взвешивают колбу и вычисляют его массу* $m_{Nle\ ts}$, затем доводят *объем раствора* до метки цитратным буфером (*см. 6.3*) и тщательно перемешивают.

Если в продукте ожидается высокое содержание аминокислот, то можно готовить разведения, используя аликвоту менее 1 *см*^{3} экстракционного раствора плюс 2,5 *см*^{3} *раствора* норлейцина $m_{Nle\ ts}$.

Если анализируемый раствор не был использован в день приготовления, то он должен храниться при температуре ниже 5 °С не более трех дней.

8.3 Приготовление анализируемых растворов с использованием объемного разведения

8.3.1 Приготовление анализируемых растворов аминокислот

Взвешивают 0,45—0,47 г лизина HCl, 0,29—0,31 г треонина, 0,36—0,38 г метионина. Навеску аминокислоты количественно переносят с раствором соляной кислоты *(см. 6.2)* в мерную колбу *вместимостью 1000 см*^{3}, добавляют раствор соляной кислоты до объема примерно 900 *см*^{3} и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Доводят *объем раствором* кислоты до метки и тщательно перемешивают.

Разведение *полученного раствора* и добавление раствора норлейцина проводят по *6.4.3.2*.

Если анализируемый раствор не был использован в день приготовления, то он должен храниться при температуре ниже 5 °С не более трех дней.

8.3.2 Приготовление анализируемых растворов премиксов и смеси аминокислот

Если в продукте ожидается низкое содержание аминокислот, то примерную массу навески продукта $m_{tp\ premix}$, г, рассчитывают, как описано в *8.2.2*. Для экстракции используют такие навески, чтобы гарантировать, что площади пиков всех аминокислот войдут в линейный диапазон градуировки. Навеску количественно переносят с раствором соляной кислоты *(см. 6.2)* в мерную колбу *вместимостью 1000 см*^{3}, добавляют раствор соляной кислоты до объема примерно 900 *см*^{3} и перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин. Доводят *объем раствором* кислоты до метки и тщательно перемешивают.

Разведение *полученного раствора* и добавление раствора норлейцина проводят по *6.4.3.2*.

Если в продукте ожидается высокое содержание аминокислот, то можно готовить разведения, используя аликвоту менее 1 *см*^{3} экстракционного раствора плюс 2,5 *см*^{3} *раствора* норлейцина.

Если анализируемый раствор не был использован в день приготовления, то он должен храниться при температуре ниже 5 °С не более трех дней.

8.4 Хроматография

Необходимый объем анализируемого раствора фильтруют через мембранный фильтр (см. 4.6) в виалу автосэмплера и вводят в аминокислотный анализатор или систему ВЭЖХ (см. 4.10). Вводимый объем, как правило, составляет 20—50 мм^3.

Хроматографическая система должна разделять аминокислоты друг от друга и от других компонентов (например, аммония, аминов, пептидов или аминосахаров).

Пики анализируемых аминокислот должны быть разделены полностью до базовой линии ото всех других полученных пиков, для того чтобы избежать ошибочных результатов, вызванных наложением пиков. Хроматографическая система должна обеспечивать линейную зависимость в диапазоне концентраций градуировочных растворов.

9 Обработка результатов

9.1 Градуировка и контроль стабильности градуировочной характеристики

Содержание аминокислот в анализируемых пробах определяют с использованием градуировочных растворов (*см. 6.4.3*). Для того чтобы убедиться в отсутствии дрейфа, для контроля стабильности вводят градуировочный раствор после каждых четырех определений. Если при этом полученные результаты определения массовой концентрации аминокислоты в градуировочном растворе не укладываются в диапазон от 99 % до 101 %, то градуировку проводят заново.

Определяют площади пиков градуировочных растворов и анализируемых растворов испытуемых проб и рассчитывают массовую долю аминокислоты в пробе по 9.2 или 9.3.

9.2 Вычисление результатов при весовом разведении

Вычисляют коэффициент чувствительности $F_{R\,aa}$ для каждой аминокислоты по формуле

$$F_{R\,aa} = \frac{A_{Nle\,c} \cdot m_{aa}}{A_{aa\,c} \cdot m_{Nle}}, \quad (2)$$

где $A_{Nle\,c}$ — площадь пика норлейцина в градуировочном растворе;
m_{aa} — масса 2,5 *см*^{3} основного раствора аминокислоты, г;
$A_{aa\,c}$ — площадь пика аминокислоты в градуировочном растворе;
m_{Nle} — масса 2,5 *см*^{3} основного раствора норлейцина, г.

Вычисляют массовую долю аминокислоты в пробе w_{aa}, %, используя формулу

$$w_{aa} = \frac{A_{aa\,ts} \cdot F_{R\,aa} \cdot \gamma_{aa} \cdot m_{Nle\,ts} \cdot m_{ex} \cdot 100}{A_{Nle\,ts} \cdot m_{tp} \cdot m_{all} \cdot 1000}, \quad (3)$$

где $A_{aa\,ts}$ — площадь пика аминокислоты в анализируемом растворе;
$F_{R\,aa}$ — коэффициент чувствительности аминокислоты;
γ_{aa} — концентрация аминокислоты в основном растворе, г/дм^3, предполагая, что *1000 см*^{3} раствора весит 1 *кг, г/кг*;
$m_{Nle\,ts}$ — масса 2,5 *см*^{3} основного стандартного раствора норлейцина в анализируемом растворе, г;
m_{ex} — масса экстракционного раствора, г;
100 — коэффициент перевода результата в проценты;
$A_{Nle\,ts}$ — площадь пика норлейцина в анализируемом растворе;
m_{tp} — масса навески, г;
m_{all} — масса используемой аликвоты экстракционного раствора, г;
1000 — коэффициент согласования единиц массы.

9.3 Вычисление результатов при объемном разведении

Вычисляют коэффициент чувствительности $F_{R\,aa}$ для каждой аминокислоты по формуле

$$F_{R\,aa} = \frac{A_{Nle\,c}}{A_{aa\,c}}, \quad (4)$$

где $A_{Nle\,c}$ — площадь пика нейролицина в градуировочном растворе;
$A_{aa\,c}$ — площадь пика аминокислоты в градуировочном растворе.

Вычисляют массовую долю аминокислоты в анализируемой пробе w_{aa}, %, по формуле

$$w_{aa} = \frac{A_{aa\,ts} \cdot F_{R\,aa} \cdot \gamma_{aa}}{A_{Nle\,ts} \cdot m_{tp}} \cdot 100, \quad (5)$$

где $A_{aa\,ts}$ — площадь пика аминокислоты в анализируемом растворе;
$F_{R\,aa}$ — коэффициент чувствительности аминокислоты;
γ_{aa} — концентрация аминокислоты в основном растворе, г/дм^3, *предполагая, что 1000 см*^{3} *раствора весит 1 кг, г/кг;*
$A_{Nle\,ts}$ — площадь пика норлейцина в анализируемом растворе;
m_{tp} — масса навески, г.

Примечание — Массовую долю аминокислоты вычисляют в продукте естественной влажности. Для определения содержания аминокислоты на сухое вещество продукта необходимо вычислить массовую долю влаги и произвести пересчет массовой доли аминокислоты с учетом этого показателя. Если продукт перед анализом был высушен, то результат, полученный по формуле (3), соответствует содержанию аминокислоты на сухое вещество.

Полученная массовая доля лизина гидрохлорида может быть пересчитана в массовую долю лизина w_{Lys}, %, по формуле

$$w_{Lys} = \frac{w_{Lys\,HCl}}{1{,}25}, \quad (6)$$

где $w_{Lys\,HCl}$ — массовая доля лизина гидрохлорида, %;
1,25 — коэффициент пересчета лизина гидрохлорида в лизин.

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторные испытания

Подробная информация о межлабораторных испытаниях на точность метода приведена в приложении А.

10.2 Повторяемость

Выполняют два параллельных испытания.

Рассчитывают *относительную погрешность D*, %, по формуле

$$D = \frac{\left| w_{aa\,1} - w_{aa\,2} \right|}{w_{aa\,med}} \cdot 100, \quad (7)$$

где $w_{aa\,1}$, $w_{aa\,2}$ — значения *массовой доли аминокислоты в анализируемой навеске двух параллельных испытаний, %;*

$w_{aa\,med}$ — *среднее арифметическое значение результатов двух параллельных испытаний;*

100 — *коэффициент пересчета в проценты.*

Принимают среднее арифметическое значение результатов двух испытаний, если *D* меньше 1,5 %.

Если относительная погрешность больше, выполняют третье испытание анализируемой пробы и определяют *среднее арифметическое* значение трех испытаний. Если CV меньше или равен 3 %, записывают *среднее арифметическое значение* трех испытаний.

Если CV выше 3 %, повторяют испытание, начиная с гомогенизации *лабораторных проб.*

Если результаты двух новых испытаний снова *не удовлетворяют условию D* меньше 1,5 %, то ошибка происходит при хроматографировании. Необходимо проверить анализатор и повторить все сомнительные испытания.

10.3 Воспроизводимость

Абсолютное *расхождение* между результатами двух отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом на *идентичных пробах* в разных лабораториях разными операторами на различных *экземплярах* оборудования, не должно превышать более чем в 5 % случаев предел воспроизводимости *R*, приведенный в приложении А.

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать по меньшей мере следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) использованный метод отбора проб, если он известен;

c) использованный метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все детали работы, не установленные в настоящем стандарте или считающиеся необязательными, наряду с подробностями всех случаев, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;

e) полученный(е) результат(ы) испытаний;

f) если повторяемость была проверена, полученный окончательный результат.

Приложение А
(справочное)

Данные совместных исследований

В совместном исследовании по определению лизина, метионина и треонина в концентрированных аминокислотных продуктах и премиксах приняли участие 17 лабораторий. Было проанализировано 13 проб в двух повторностях: четыре аминокислоты и девять премиксов.

Таблица А.1

Коммерческая аминокислота или премикс	Аминокислота[a)]	Ожидаемое значение, %	Количество лабораторий	Среднее значение, %	Стандартное отклонение повторяемости S_r	CV от повторяемости $C_{V,r}$, %	Стандартное отклонение воспроизводимости S_R	CV от воспроизводимости $C_{V,R}$, %	Предел повторяемости $r = 2{,}8 S_r$	Предел воспроизводимости $R = 2{,}8 S_R$	Значение Хорвата
№ 1 Биолиз	Lys		17	45,89	0,39	0,84	1,06	2,31	1,08	2,96	1,03
№ 2 премикс	Met	27,00	16	26,55	0,41	1,56	0,49	1,85	1,16	1,37	0,76
	Thr	15,00	16	14,85	0,19	1,29	0,35	2,33	0,54	0,97	0,88
№ 3 премикс	Lys	20,80	17	20,56	0,27	1,33	0,51	2,49	0,77	1,44	0,98
	Met	11,00	17	11,26	0,14	1,24	0,21	1,84	0,39	0,58	0,66
	Thr	8,00	17	8,22	0,05	0,65	0,16	1,9	0,15	0,44	0,65
№ 4 премикс	Lys	16,80	17	16,63	0,22	1,29	0,39	2,32	0,6	1,08	0,89
	Met	14,00	17	14,21	0,13	0,93	0,27	1,92	0,37	0,76	0,72
	Thr	11,00	17	11,19	0,09	0,82	0,25	2,22	0,26	0,7	0,8
№ 5 премикс	Lys	12,80	17	12,58	0,09	0,74	0,23	1,86	0,26	0,65	0,68
	Met	32,00	17	32,04	0,16	0,5	0,83	2,59	0,45	2,32	1,09
	Thr	22,00	17	22,1	0,18	0,81	0,43	1,94	0,5	1,2	0,77
№ 6 премикс	Lys	12,29	17	12,3	0,21	1,68	0,26	2,13	0,58	0,73	0,78
	Met	30,72	17	30,59	0,32	1,06	0,76	2,5	0,9	2,14	1,05
	Thr	21,12	17	21,25	0,25	1,18	0,4	1,87	0,7	1,11	0,74
№ 7 премикс	Lys	10,40	17	10,27	0,12	1,21	0,19	1,81	0,35	0,52	0,64
	Met	9,00	17	9,1	0,08	0,92	0,13	1,48	0,23	0,38	0,52
	Thr	14,00	17	14,03	0,1	0,7	0,29	2,07	0,27	0,81	0,77
№ 8 премикс	Lys	10,24	17	10,12	0,12	1,2	0,15	1,5	0,34	0,42	0,53
	Met	8,86	17	8,91	0,08	1,17	0,17	1,89	0,29	0,47	0,66
	Thr	13,79	17	13,83	0,19	1,35	0,31	2,25	0,52	0,87	0,84
№ 9 премикс	Lys	24,00	17	23,48	0,26	1,13	0,5	2,15	0,74	1,41	0,86
	Met	19,00	17	19,09	0,19	0,99	0,33	1,73	0,53	0,93	0,67
	Thr	15,00	17	15,09	0,15	1	0,3	1,99	0,42	0,84	0,75
№ 10 премикс	Lys	23,28	17	22,85	0,19	0,84	0,41	1,78	0,54	1,14	0,71
	Met	18,43	17	18,65	0,13	0,68	0,29	1,53	0,36	0,8	0,59
	Thr	14,55	17	14,65	0,14	0,96	0,31	2,15	0,4	0,88	0,81

Окончание таблицы А.1

Коммерческая аминокислота или премикс	Аминокислота[a)]	Ожидаемое значение, %	Количество лабораторий	Среднее значение, %	Стандартное отклонение повторяемости S_r	CV от повторяемости $C_{V,r}$, %	Стандартное отклонение воспроизводимости S_R	CV от воспроизводимости $C_{V,R}$, %	Предел повторяемости $r = 2{,}8_{Sr}$	Предел воспроизводимости $R = 2{,}8_{SR}$	Значение Хорвата
№ 11 L-лизин HCl	Lys	76,04	17	74,11	0,69	0,93	1,32	1,78	1,93	3,7	0,85
№ 12 DL-метионин	Met	93,55	17	93,27	0,79	0,85	1,42	1,52	2,22	3,98	0,75
№ 13 L-треонин	Thr	95,95	17	95,46	1,11	1,17	2,07	2,16	3,12	5,78	1,07

[a)] Lys — лизин; Met — метионин; Thr — треонин.

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта

Таблица ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного стандарта ISO 17180:2013		
Подраздел	Пункт	Подпункт	Подраздел	Пункт	Подпункт
Раздел 1			Раздел 1		
Раздел 2			—		
Раздел 3			Раздел 2		
Раздел 5			Раздел 3		
5.1	—	—	3.1	—	—
5.2	5.2.1	—	3.2	3.2.1	—
—	5.2.2	—	—	3.2.2	—
—	5.2.3	—	—	3.2.3	—
5.3	—	—	3.3	—	—
5.4, 6.1	—	—	3.4	—	—
5.5	—	—	3.5	—	—
5.6	—	—	3.6	—	—
5.7	—	—	3.7	—	—
5.8	—	—	3.8	—	—
6.3	—	—	3.9	—	—
6.2	—	—	3.10	—	—
6.4	6.4.1	—	3.11	3.11.1	—
—	6.4.2	—	—	3.11.2	—
	6.4.3	6.4.3.1		3.11.3	3.11.3.1
—	—	6.4.3.2	—	—	3.11.3.2
5.9			3.12		
5.10	—	—	3.13	—	—
Раздел 4			Раздел 4		
4.1—4.10			4.1—4.10		
4.11	—	—	—	—	—
4.12	—	—	—	—	—
4.13	—	—	—	—	—
4.14	—	—	—	—	—
4.15	—	—	—	—	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура настоящего стандарта			Структура международного стандарта ISO 17180:2013		
Подраздел	Пункт	Подпункт	Подраздел	Пункт	Подпункт
Раздел 7, 8			Раздел 5		
7.1	—	—	—	—	—
7.2	—	—	5.1	—	—
8.1	—	—	5.2	—	—
8.2	8.2.1	—	5.3	5.3.1	—
—	8.2.2	—	—	5.3.2	—
8.3	8.3.1	—	5.4	5.4.1	—
—	8.3.2	—	—	5.4.2	—
8.4	—	—	5.5	—	—
Раздел 9			Раздел 6		
9.1	—	—	6.1	—	—
9.2	—	—	6.2	—	—
9.3	—	—	6.3	—	—
Раздел 10			Раздел 7		
10.1	—	—	7.1	—	—
10.2			7.2		
10.3	—	—	7.3	—	—
Раздел 11			Раздел 8		
Приложение А			Приложение А		
Приложение ДА			—		

Примечания

1 В соответствии с ГОСТ 1.5—2001 в настоящий стандарт добавлен раздел 2 «Нормативные ссылки».

2 Раздел 3 международного стандарта «Реактивы и материалы» представлен в настоящем стандарте разделом 5 с добавлением не указанных в международном стандарте реактивов.

3 Из раздела 3 международного стандарта подразделы, описывающие приготовление растворов, перенесены в раздел 6.

4 В раздел 4 настоящего стандарта введены подразделы с указанием используемого оборудования.

5 В соответствии с ГОСТ 1.5—2001 настоящий стандарт дополнен разделом 7 и подразделом 7.1 «Отбор проб».

6 В соответствии с ГОСТ 1.5—2001 и ГОСТ 1.3—2008 настоящий стандарт дополнен приложением ДА «Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта».

УДК 636.085.3:006.354 МКС 65.120

Ключевые слова: комбикормовая продукция, премиксы, комбикормовое сырье, метод, метионин, лизин, треонин, норлейцин, аминокислотный анализатор, ВЭЖХ, экстракция, дериватизация, нингидрин, ортофталдиальдегид (ОРА), весовое разведение, объемное разведение

Редактор переиздания *Е.И. Мосур*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Л.В. Софейчук*

Сдано в набор 14.05.2020. Подписано в печать 14.07.2020. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л 1,40.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11
www.jurisizdat.ru gost.e-ecolog.ru

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 gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru