ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 51416— 99 (ИСО 5510—84)

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Определение массовой доли доступного лизина

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Временным творческим коллективом, образованным в рамках договора № М98 42 002 Е 4075 между АФНОР и ВНИЦСМВ с участием членов Технического комитета по стандартизации ТК 004 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 004 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 571-ст

4 Настоящий стандарт, за исключением 2, 6.6, 6.7, 6.8 и 7, представляет собой аутентичный текст международного стандарта ИСО 5510—84 «Корма для животных. Определение доступного лизина»

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июль 2020 г.

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». 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.e-ecolog.ru

© ИПК Издательство стандартов, 2000
© Стандартинформ, оформление, 2020

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 Определение 1
4 Сущность метода 2
5 Реактивы 2
6 Средства контроля 3
7 Отбор проб 3
8 Проведение испытания 3
9 Обработка результатов 5
10 Оформление результатов измерений 6
Библиография 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Определение массовой доли доступного лизина

Feeds, mixed feeds and raw material. Determination of available lysine massfraction

Дата введения — 2001—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения доступного лизина в кормах, содержащих белки животного или растительного происхождения.

Лизин кормов считается усвояемым в том случае, если в нем не связана конечная аминогруппа (аминогруппа ε). Определяют эту фракцию лизина, используя способность связанных конечных аминогрупп соединяться с 2,4-динитрофторбензолом.

Однако данный метод по сравнению с биологическим завышает содержание доступного лизина, поэтому следует быть осторожным при интерпретации полученных результатов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 13496.0 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ Р 51417 (ИСО 5983—97) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Метод Къельдаля[1)]

ГОСТ Р 51419 (ИСО 6498—98) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб[2)]

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 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 заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Определение

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

доступный лизин: Масса лизина, представляющая разницу между массами общего и недоступного лизина, определяемыми при условиях, установленных настоящим стандартом. Результат выражают в процентах в испытуемом продукте.

[1)] Действует ГОСТ 32044.1—2012 (ISO 5983-1:2005) «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Часть 1. Метод Къельдаля».

[2)] Действует ГОСТ ISO 6498—2014 «Корма, комбикорма. Подготовка проб для испытаний».

Издание официальное

4 Сущность метода

Измельченную навеску пробы гидролизуют хлористоводородной кислотой, общий лизин выделяют при помощи хроматографии на колонке и измеряют его содержание на спектрометре при длине волны 570 нм.

Вторую навеску измельченной пробы обрабатывают спиртовым раствором 2,4-динитрофторбензола в щелочной среде, очищают, гидролизуют хлористоводородной кислотой, выделяют недоступный лизин при помощи хроматографии на колонке и измеряют его содержание на спектрофотометре при 570 нм.

5 Реактивы

Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а. Вода должна быть дистиллированной.

5.1 Диэтиловый эфир, свободный от перекисей.

5.2 Кислый углекислый натрий, раствор массовой концентрации 80 г/дм^3.

5.3 Спиртовый раствор 2,4-динитрофторбензола (ДНФБ)

В 12 см^3 95%-ного (по объему) этилового спирта растворяют 0,15 см^3 ДНФБ.

Раствор готовят перед использованием.

5.4 Раствор хлористоводородной кислоты молярной концентрации 6 моль/дм^3

Один объем хлористоводородной кислоты плотностью 1,19 г/см^3 смешивают с одним объемом дистиллированной воды.

5.5 Лимоннокислый натрий, буферный раствор pH 2,2

Последовательно растворяют в дистиллированной воде 21 г лимонной кислоты; 8 г гидроокиси натрия; 16 см^3 хлористоводородной кислоты плотностью 1,19 г/см^3; 0,1 см^3 октиловой (каприловой) кислоты; 20 см^3 тиодигликоля; 3 см^3 30%-ного (по объему) водного раствора додецилового эфира полиоксиэтилена с приблизительно 23 молекулами оксиэтилена. Объем раствора доводят до 1000 см^3 дистиллированной водой.

5.6 Лимоннокислый натрий, буферный раствор pH 5,28

Последовательно растворяют в дистиллированной воде 24,5 г одноводной лимонной кислоты; 14 г гидроокиси натрия; 6,8 см^3 хлористоводородной кислоты плотностью 1,19 г/см^3; 0,1 см^3 октиловой (каприловой) кислоты; 3 см^3 30%-ного (по объему) водного раствора додецилового эфира полиэтоксила с приблизительно 23 молекулами оксиэтилена. Объем раствора доводят до 1000 см^3 дистиллированной водой. Устанавливают pH 5,28 ± 0,02, используя хлористоводородную кислоту плотностью 1,19 г/см^3 или раствор гидроокиси натрия массовой долей 50 %.

5.7 Нингидриновый реактив

5.7.1 Пропионовокислый натрий, буферный раствор pH 5,5 ± 0,1

В приблизительно 400 см^3 дистиллированной воды растворяют 168 г гидроокиси натрия. Охлаждают, затем при встряхивании добавляют 498 см^3 пропионовой кислоты. Объем раствора доводят до 1000 см^3 дистиллированной водой.

5.7.2 Приготовление реактива

Нингидриновый реактив готовят в атмосфере азота и в темноте. В колбу вместимостью 2000 см^3 помещают 1000 см^3 свободного от перекисей монометилового эфира этиленгликоля, 1000 см^3 буферного раствора пропионовокислого натрия и 40 г нингидрина. Встряхивают до полного растворения, затем добавляют 1,33 г 2-водного хлористого олова (II) ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$). Перемешивают встряхиванием до полного растворения. (См. примечание.)

Реактив устойчив в течение 1 мес при хранении при 4 °С под небольшим давлением в атмосфере азота и в темноте.

Примечание — Если наблюдается выпадение осадка хлористого олова (II), его заменяют 7,5 см^3 раствора хлористого титана массовой концентрации 150 г/дм^3 или 1,5 г гидриндантина на 1 дм^3 реактива.

5.8 Лизин, стандартный раствор молярной концентрации *c* 1 мкмоль/дм^3

В 100 см^3 раствора хлористоводородной кислоты молярной концентрации *c*(HCl) = 0,1 моль/дм^3 растворяют 182,5 мг моногидрохлорида лизина. Отбирают точно 10 см^3 этого раствора и разбавляют его до 100 см^3 буферным раствором лимоннокислого натрия pH 2,2 (5.5). 1 см^3 этого раствора содержит 1 мкмоль лизина.

6 Средства контроля

Обычная лабораторная аппаратура, а также указанная в 6.1—6.8.

6.1 Колбы плоскодонные вместимостью 250 и 1000 см^3, короткогорлые с притертым коническим шлифом, и обратные холодильники, подходящие к колбам.

6.2 Тигли с фильтрующей пористой стеклянной пластинкой Р16 (размер пор от 10 до 16 мк).

6.3 Масляная баня температурой, обеспечивающей обратную конденсацию (от 120 °С до 130 °С).

6.4 Ротационный испаритель.

6.5 Автоанализатор аминокислот или система для хроматографии вручную, включающая:

а) хроматографическую колонку длиной около 250 мм и внутренним диаметром 6 мм, термостатируемая при 55 °С при помощи водяной рубашки с циркулирующей водой и заполненная до высоты 200 мм 8%-ной сильнокислой катионобменной смолой с поперечными связями и функциональными сульфогруппами, размер частиц (13 ± 2) мк;

б) небольшой поршневой насос, обеспечивающий скорость потока 50 см^3/ч;

в) коллектор фракций;

г) кипящую водяную баню;

д) спектрометр со спектральной областью, включающей 570 нм, с кюветами толщиной 10 мм.

6.6 Градуировочные пипетки вместимостью 1,5 и 10 см^3 с допускаемой относительной погрешностью ± 1 %.

6.7 Мерные колбы вместимостью 10, 20 и 100 см^3 с допускаемой относительной погрешностью ± 0,2 %.

6.8 Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

7 Отбор проб

7.1 Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

8 Проведение испытания

8.1 Подготовка проб — по ГОСТ Р 51419.

8.2 Взятие навески

Две навески, взятые на весах 2-го класса точности, массой, содержащей около 100 мг сырого протеина, помещают в две колбы (6.1). Содержание сырого протеина определяют по ГОСТ Р 51417.

8.3 Общий лизин

8.3.1 Гидролиз хлористоводородной кислотой

В колбу вместимостью 1000 см^3 к навеске добавляют 500 см^3 хлористоводородной кислоты молярной концентрации *c*(HCl) = 6 моль/дм^3. Закрывают колбу обратным холодильником и помещают в масляную баню, предварительно нагретую до 120 °С — 130 °С.

После медленного кипячения в течение 24 ч колбу охлаждают и содержимое фильтруют через тигель. Фильтрат выпаривают при температуре не выше 40 °С на ротационном испарителе. К остатку добавляют дистиллированную воду и снова выпаривают. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не будет удалена хлористоводородная кислота; для этого обычно достаточно четыре обработки, используя каждый раз по 30 см^3 дистиллированной воды. Остаток растворяют в буферном растворе pH 2,2 и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Объем раствора доводят до метки буферным раствором pH 2,2. Фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

8.3.2 Заключительная подготовка колонки и хроматография гидролизата

Насос анализатора присоединяют к емкости, содержащей буферный раствор лимоннокислого натрия с pH 5,28 (5.6). Затем его регулируют, чтобы обеспечить скорость потока жидкости 50 $см^3$/ч. Насос присоединяют в колонке со смолой, нагретой предварительно до 55 °С, и в течение 20 мин через колонку пропускают буферный раствор, чтобы установилось равновесие. Насос отсоединяют. Удаляют большую часть жидкости над смолой, следя при этом, чтобы поверхность смолы все время была покрыта жидкостью.

При помощи пипетки 0,5 $см^3$ гидролизата (или 1 $см^3$, если ручная система) наносят на колонку и пропускают его через колонку под небольшим давлением азота. Стенки колонки обмывают 0,5 $см^3$ буферного раствора pH 5,28 и пропускают через колонку. Колонку доверху заполняют буферным раствором и присоединяют к насосу.

8.3.3 Определение

8.3.3.1 Автоматизированная система

Включают анализатор. Прибор градуируют по 8.3.2, используя 0,25 мкмоль лизина (0,25 $см^3$ стандартного раствора лизина) или массу лизина, установленную в инструкции к анализатору.

8.3.3.2 Ручная система

8.3.3.2.1 Локализация лизина

Фракцию элюата, содержащую лизин, определяют, используя раствор лизина известной концентрации, например 1 мкмоль/$см^3$. Для этого отбрасывают первые 25—30 $см^3$ элюата и затем собирают в пробирки фракции по 1 $см^3$ до тех пор, пока не получат 50 фракцию, считая с начала элюирования. К каждой фракции между 30 и 50 фракциями добавляют по 1 $см^3$ нингидринового реактива. Перемешивают, переносят в кипящую водяную баню и оставляют на 15 мин. Охлаждают и разбавляют путем добавления 10 $см^3$ буферного раствора pH 5,28.

Примечание — Исключительно для информации: при описанных условиях лизин обычно элюируется между 39 и 45 фракциями.

8.3.3.2.2 Определение

Если лизин элюировался между 39 и 45 фракциями, отбрасывают первые 38 $см^3$ элюата, собирают и смешивают фракции (от 39 до 45), соответствующие пику лизина, и высушивают на ротационном испарителе.

Примечание — После получения фракций, содержащих лизин, через колонку пропускают еще около 200 $см^3$ буферного раствора, чтобы удалить нежелательные компоненты, которые могут остаться.

Остаток растворяют в 5 $см^3$ буферного раствора pH 5,28 и добавляют 5 $см^3$ нингидринового реактива. Перемешивают, переносят в кипящую водяную баню и оставляют на 15 мин. Охлаждают и разбавляют буферным раствором pH 5,28, чтобы концентрация лизина в измеряемом растворе составляла приблизительно 0,02 мкмоль/$см^3$. (Пусть V_1 — объем полученного таким образом измеряемого раствора.)

Измеряют поглощение на спектрометре при 570 нм против жидкости, представляющей смесь одного объема буферного раствора и одного объема нингидринового реактива, которую предварительно помещают на 15 мин в кипящую водяную баню, и после охлаждения разбавляют до объема V_1.

8.3.3.2.3 Градуировка спектрометра

Отбирают точно 5 $см^3$ стандартного раствора лизина, прибавляют 5 $см^3$ нингидринового реактива. Перемешивают, ставят на 15 мин в кипящую водяную баню. Охлаждают и разбавляют до 100 $см^3$ буферным раствором pH 5,28.

Измеряют поглощение на спектрометре при тех же условиях, как в 8.3.3.2.2.

8.4 Недоступный лизин

8.4.1 Реакция динитрофенилирования

В колбу вместимостью 250 $см^3$, где находится вторая навеска испытуемой пробы (см. 8.2), при помощи пипетки переносят 8 $см^3$ раствора кислого углекислого натрия. Оставляют приблизительно на 10 мин, помешивая время от времени. Затем добавляют раствор ДНФБ, колбу закрывают, содержимое перемешивают, следя за тем, чтобы не осталось частичек, прилипших к стенкам колбы. Смесь оставляют на ночь при комнатной температуре в темном месте.

8.4.2 Очистка

Жидкость выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре ниже 40 °С. Затем в колбу добавляют 75 $см^3$ диэтилового эфира, перемешивают и дают отстояться. Выливают большую

часть диэтилового эфира с предосторожностями, чтобы не удалить при этом твердые частички. Эту операцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 50 см^3 диэтилового эфира. Оставшиеся следы диэтилового эфира удаляют путем нагревания на ротационном испарителе.

8.4.3 Гидролиз хлористоводородной кислотой

В колбу вносят 150 см^3 хлористоводородной кислоты и выполняют процедуры по 8.3.1, но гидролизат, растворенный в буферном растворе pH 2,2, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 20 см^3 (или 10 см^3 при использовании ручной системы).

8.4.4 Хроматография гидролизата и определение по 8.3.2 и 8.3.3.

В ручном варианте измерение на спектрофотометре можно проводить после разбавления смеси лизин плюс реактив до 20 см^3 буферным раствором pH 5.28. (Пусть V_1 — объем полученного таким образом измеряемого раствора.)

8.5 Количество определений

Проводят два параллельных определения, используя две разные пары навесок испытуемой пробы.

9 Обработка результатов

9.1 Метод вычисления общего лизина

9.1.1 Определение на автоанализаторе

Массовую долю общего лизина в испытуемой пробе X_1, %, вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{0{,}25 \cdot 0{,}146 \cdot 100 \cdot 100 \cdot S_1}{m_1 \cdot V_0 \cdot 1000 \cdot S_0} \cdot 100, \qquad (1)$$

где 0,25 — объем стандартного раствора лизина, нанесенный на колонку, см^3;

0,146 — массовая концентрация стандартного раствора лизина, мг/см^3;

100 — объем гидролизата пробы, см^3;

100 — коэффициент пересчета в проценты;

S_1 — площадь пика общего лизина, определяемого по 8.3.3.1, мм^2;

S_0 — площадь пика лизина массой 0,25 мкмоль, мм^2;

m_1 — масса навески, взятой для определения общего лизина в первую колбу, г;

V_0 — объем гидролизата, перенесенного на колонку (обычно V_0 = 0,5 см^3), см^3;

1000 — коэффициент пересчета мг в г.

9.1.2 Определение вручную

Массовую долю общего лизина в испытуемой пробе X_1, %, вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{V_1 \cdot 0{,}73 \cdot A_1}{m_1 \cdot V_0 \cdot 1000 \cdot A_0} \cdot 100, \qquad (2)$$

где A_1 — оптическая плотность, определяемая по 8.3.2.2;

V_1 — объем измеряемого раствора, см^3;

100 — коэффициент пересчета в проценты;

0,73 — масса лизина в 5 см^3 стандартного раствора лизина, мг;

A_0 — оптическая плотность стандартного раствора лизина, определяемая по 8.3.3.2.3;

V_0 — объем перенесенного на колонку гидролизата (обычно V_0 = 1 см^3), см^3;

m_1 — масса навески, помещенной в первую колбу, г;

1000 — коэффициент пересчета мг в г.

9.2 Недоступный лизин

9.2.1 Определение на автоанализаторе

Массовую долю недоступного лизина в испытуемой пробе X_2, %, вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{0{,}073}{m_2 \cdot V_0} \cdot \frac{S_2}{S_0}, \qquad (3)$$

где S_2 — площадь пика, соответствующего недоступному лизину, определяемому по 8.4.4, мм^2;

S_0 — площадь пика, соответствующего 0,25 ммоль лизина, мм^2;
m_2 — масса навески, помещенной во вторую колбу, г;
V_0 — объем перенесенного на колонку гидролизата (обычно V_0 = 0,5 см^3), см^3.

9.2.2 Определение вручную

Массовую долю недоступного лизина в испытуемой пробе X_2, %, вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{V_2 \cdot 0{,}0073}{m_2 \cdot V_0} \cdot \frac{A_2}{A_0}, \quad (4)$$

где A_2 — оптическая плотность, определяемая по 8.4.4;
V_2 — объем измеряемого раствора (обычно V_2 = 20 см^3), см^3;
A_0 — оптическая плотность стандартного раствора лизина, определяемая по 8.3.3.2.3;
V_0 — объем перенесенного на колонку гидролизата (обычно V_0 = 1 см^3), см^3;
m_2 — масса навески, помещенной во вторую колбу, г.

9.3 Доступный лизин

Массовую долю доступного лизина в испытуемой пробе X_3, %, вычисляют по формуле

$$X_3 = X_1 - X_2, \quad (5)$$

где X_1 — массовая доля общего лизина (см. 9.1);
X_2 — массовая доля недоступного лизина (см. 9.2).

Примечание — Массовую долю доступного лизина в общем лизине, %, вычисляют по формуле

$$\frac{X_1 - X_2}{X_1} \cdot 100. \quad (6)$$

9.4 Сходимость

Расхождение результатов двух параллельных определений не должно превышать 10 % от их среднего арифметического значения.

9.5 Воспроизводимость

Расхождение результатов двух определений, выполненных при различных условиях, не должно превышать 20 % от их среднего арифметического значения.

10 Оформление результатов измерений

В отчете об испытании должны быть указаны:
- используемый метод;
- полученные результаты;
- любые условия проведения испытаний, не установленные данным стандартом и касающиеся подробностей, которые могли повлиять на результат.

В отчете должны быть все данные, необходимые для полной идентификации пробы.

Библиография

[1] ИСО 6497 Корма для животных. Методы отбора проб

УДК 636.085.3:006.354 ОКС 65.120

Ключевые слова: корма, сырой протеин, лизин, общий лизин, недоступный лизин, динитрофторбензол, нингидрин, анализатор аминокислот, спектрометр

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

Сдано в набор 27.07.2020. Подписано в печать 24.11.2020. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,67.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru