« СОГЛАСОВАНО »

Заместитель директора ГП «Центр эталонов, стандартизации и метрологии »



_____ В.П. Лоско

«___» _____ 2000 г.

« УТВЕРЖДАЮ »

Главный Государственный санитарный врач Республики Беларусь, заместитель министра здравоохранения

_____ В.П. Филонов

«14» июля 2000 г.

МЕТОД

по определению аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

МВИ. МН 1363-2000

Минск 2000 г.

gost.e-ecolog.ru

Содержание: стр.

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 3

2. НОРМЫ ПОГРЕШНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ 4

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ 4

3.1. Средства измерений: 4
3.2. Вспомогательные устройства: 5
3.3. Материалы: 5

4. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ 6

5. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ 6

6. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА 6

7. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ 6

8. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ 6

8.1. Подготовка измерительной аппаратуры 6
8.2. Получение бидистиллированной воды 7
8.2.1. Приготовление буферных растворов и реактивов 7
8.3. Приготовление градуировочных растворов 8
8.3.1. Приготовление градуировочных растворов смеси 17 аминокислот без триптофана 8
8.3.2. Приготовление градуировочных растворов триптофана 8
8.4. Подготовка к анализу градуировочных растворов аминокислот 9
8.5.1. Контроль градуировочного графика 10
8.5.2. Оперативный контроль градуировочного графика 10
8.6. Отбор проб, подготовка анализируемых образцов 11
8.6.1. Кислотный гидролиз продуктов 11
8.6.2. Щелочной гидролиз продуктов 11
8.7. Получение ДАБС производных аминокислот 11

9. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ 12

10. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ 12

11. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ 13

12.КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ МВИ 13

12.1. Средства контроля погрешности методики выполнения измерений 13
12.2. Порядок проведения контроля сходимости 13
12.3. Порядок проведения контроля воспроизводимости 14
12.4. Порядок проведения контроля точности 14
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 ..... *17*
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 ..... *18*
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 ..... *19*
ПРИЛОЖЕНИЕ 4 20

1. Назначение и область применения

Метод предназначен для определения концентрации 18 аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением компьютерной системы регистрации, обработки и хранения информации

Краткая характеристика аминокислот.

L-Аланин CH_3CHNH_2COOH. Молекулярный вес-89,09. Из воды кристаллизуется в виде ромбовидных кристаллов. Растворимость в воде: 16,65 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 28,75 г при 75 ^{0}C, не растворим в эфире, уксусной кислоте. Температура плавления 297 ^{0}C с разложением. Без вкуса.

L-Аргинин $C_6H_{14}O_2N_4$. Молекулярный вес-174,21.Из воды кристаллизуется в виде призм, из спирта в виде пластинок. Растворимость в воде: 15 г на 100 г воды при 21 ^{0}C, не растворим в спирте, эфире. Температура плавления 233 ^{0}C с потемнением. 238 ^{0}C с разложением. Без вкуса.

L-Аспарагиновая кислота $C_4H_7O_4N$. Молекулярный вес-133,1. Из воды кристаллизуется, как окрашенные кристаллы в виде ромбовидных листочков. Растворимость в воде: 0,5 г на 100 г при 25 ^{0}C и 2,875 г при температуре 75 ^{0}C, растворимость в 100 г спирта - 0,000016 г при 25 ^{0}C. Температура плавления 269 ^{0}C с разложением. Слегка горький вкус.

L-Валин $C_5H_{11}O_2N$. Молекулярный вес-117,15. Кристаллизуется из разбавленного спирта в виде листочков. Растворимость в воде: 8.85 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 10,24 г при 65 ^{0}C, слабо растворим в спирте, не растворим в эфире. Температура плавления 315 ^{0}C с разложением. Без вкуса.

L-Гистидин $C_6H_9O_2N_3$. Молекулярный вес-155,16. Кристаллизуется из разбавленного спирта и воды в виде листочков. Растворимость в воде: 4,16 г на 100 г воды при 25 ^{0}C, слабо растворим в спирте, не растворим в эфире. Температура плавления 287 ^{0}C с разложением. Слегка горький вкус.

L-Глицин $C_2H_5O_2N_3$. Молекулярный вес-75,07. Белые моноклинные кристаллы. Растворимость в воде: 24,99 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 54,39 г при 75 ^{0}C, растворимость в 100 г 90% спирта составляет 0,043 г на 100 г спирта. Температура плавления 292 ^{0}C с разложением. Без вкуса.

L-Глютаминовая кислота $C_5H_9O_4N$. Молекулярный вес-147,15. Белые иглоподобные кристаллы Растворимость в воде: 0,864 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 5,53 г при 75 ^{0}C, растворимость в 100 г 75% спирта составляет 0,00027 г. Температура плавления 249 ^{0}C с разложением. Мясной вкус.

L-Изолейцин $C_6H_{13}O_2N$ .I Молекулярный вес-31,17. кристаллизуется из спирта в виде листочков и пластинок. Растворимость в воде: 4,12 г на 100 г воды при 25 ^{0}C, растворим в горячей уксусной кислоте, не растворим в эфире. Температура плавления 285 ^{0}C с разложением и 6,08 г при 75 ^{0}C. Горький вкус.

L-Лейцин $C_6H_{13}O_2N$. Молекулярный вес-131,17. Из воды кристаллизуется в виде окрашенных листочков. Растворимость в воде: 2,19 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 3,82 г при 75 ^{0}C, растворим в ледяной уксусной кислоте 10,9 г, не растворим в эфире Температура плавления 337 ^{0}C с разложением в закрытой трубке. Горьковатый вкус.

L-Лизин $C_6H_{14}O_2N_2$. Молекулярный вес -146,19. Из воды и разбавленного спирта кристаллизуется в виде игл и шестиугольных пластинок. Растворимость в воде:5,54 г на 100 г воды при температуре 25 ^{0}C и 15,31 г при температуре 75 ^{0}C, не растворим в эфире. Температура плавления 224 ^{0}C с разложением. Без вкуса.

L-Метионин $C_5H_{11}O_2NS$. Молекулярный вес -149,21. Кристаллы в виде шестиугольных пластинок. Растворимость в воде: 3,5 г на 100 г воды при 25 ^{0}C, нерастворим в спирте, эфире. Температура плавления 283 ^{0}C с разложением, при температуре 278 ^{0}C темнеет. Пресный вкус.

L-Пролин $C_5H_9O_2N$. Молекулярный вес -115,13. Из спирта кристаллизуется в виде игл, из воды - в виде призм. Растворимость в воде: 162,3 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 293,08 г при 65 ^{0}C, растворим в спирте 1,18 г при 21 ^{0}C, нерастворим в эфире, пропаноле, бутаноле. Температура плавления 222 ^{0}C с разложением. Без вкуса.

L-Серин $C_3H_7O_3N$. Молекулярный вес-105,09. Кристаллы в виде шестиугольных пластинок или призм. Растворимость в воде: 25 г на 100 г воды при 20 ^{0}C. Температура плавления 223-228 ^{0}C с разложением. Слегка сладкий вкус.

L-Тирозин $C_9H_{11}O_3N$. Молекулярный вес -181,199. Шелковистые иглоподобные кристаллы. Растворимость в воде: 0,045 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 0,244 г при 75 ^{0}C. Растворим в щелочах, не растворим в эфире, ацетоне. Температура плавления 242-244 ^{0}C с разложением. Горьковатый вкус.

L-Треонин $C_4H_9O_3N$. Молекулярный вес -119,12. Белые кристаллы. Растворимость в воде: 20,5 г на 100 г воды при 25 ^{0}C, не растворим в эфире, спирте. Температура плавления 235 ^{0}C при 253 ^{0}C разлагается. Слегка сладкий вкус.

L-Триптофан $C_{11}H_{12}O_2N_2$. Молекулярный вес - 204,22. Из разбавленного спирта кристаллизуется в виде пластинок и листочков Растворимость в воде: 1,14 г на 100 г воды при 25 ^{0}C и 2,80 г при 75 ^{0}C, растворим в горячем пиридине, разбавленных щелочах, слабо растворим в спирте, не растворим в эфире, хлороформе. Температура плавления 281-282 ^{0}C. Пресный вкус.

L-Фенилаланин $C_9H_{11}O_2N$ M=165,19. Из воды кристаллизуется в виде листочков. Растворимость в воде:2,96 г на 100 г воды при 25 ^{0}C, нерастворим в спирте, в эфире. Температура плавления 283-284 ^{0}C с разложением. Слегка горький вкус.

L-Цистеин $C_3H_7O_2NS$ M=121,15. Кристаллический порошок. Хорошо растворим в воде и спирте, не растворим в этиловом эфире. Трудно определим из-за окисления в цистин. Без вкуса.

2. Нормы погрешности измерений

Метод выполнения измерений обеспечивает определение содержания аминокислот в диапазоне от 10 мг/100 г продукта до 20000 мг/100 г продукта в ниже перечисленных продуктах, в которых содержание белка колеблется от 6 до 95 %.

Хлебобулочные изделия – мука, хлеб, зерно (содержание белка 8-15 %);

Мясомолочные изделия – мясо, сыр, колбасы - (10 – 50 %);

Соевые изделия – соевая мука (обезжиренная), изолят, концентрат - (26 –95%).

Обязательным условием метода является предварительное определение концентрации белка в продукте (метод Кьельдаля или с привлечением справочных данных). После проведения гидролиза рассчитывают объем воды в котором необходимо растворить гидролизат, чтобы концентрация белка находилась в диапазоне от $30\text{-}100*10^{-3}$ мг/мл. Из полученного объёма отбирают 0.02 $см^3$ и получают ДАБС-производные аминокислот. Данный метод позволяет определить содержание аминокислот в продуктах с погрешностями, не превышающими значений, приведенных в табл. 1.

Таблица 1

Метрологические показатели метода определения аминокислот с помощью ВЭЖХ

Аминокислота	Границы доверительного интервала случайной составляющей погрешности МВИ, $\Delta x_{пр.}$,% n=2			Относительная суммарная погрешность ΔМВИ, %		
	Хлебобу-лочные	Мясомолочные изделия	Соевые изделия	Хлебобулочные изделия	Мясомолочные изделия	Соевые изделия
Аспарагиновая	2,53	2,25	1,06	23,49	23,49	23,56
Глютаминовая	1,17	2,22	0,86	22,92	22,92	22,99
Серин	2,84	2,61	1,67	23,16	23,16	23,24
Треонин	3,78	2,31	1,83	22,55	22,55	22,63
Глицин	2,84	2,31	2,67	22,31	22,31	22,39
Аланин	2,25	3,11	1.83	22,63	22,63	22,71
Аргинин	2,31	2,31	1,64	22,76	22,76	22,84
Пролин	2,08	2,95	2.03	22,12	22,12	22,20
Валин	2,86	2,67	1,89	22,14	22,14	22,22
Метионин	16,65	3,31	2,86	26,68	21,94	22,02
Лейцин	2,17	2,39	2,56	20,36	20,36	20,45
Изолейцин	1,95	2,61	1,89	22,29	22,29	22,38
Фенилаланин	2,09	3,20	1,78	21,98	21,98	22,06
Цистеин	7,67	7,34	3,03	23,01	22,14	22,22
Лизин	2,61	2,17	1,75	22,12	22,12	22,20
Гистидин	6,37	3,11	2,17	22,09	22,09	22,17
Тирозин	2,58	2,92	2,39	22,10	22,10	22,19
Триптофан	4,16	5,18	4,09	20,33	20,33	20,33

Нижний предел измерения составляет $2\bullet10^{-7}$ мг аминокислоты в анализируемом объеме пробы (0,02 $см^3$).

Линейный диапазон определения всех аминокислот составляет от $25\bullet10^{-4}$ до $400\bullet10^{-4}$ мг/100г продукта.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений должны быть применены следующие средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы:

3.1. Средства измерений:

Хроматограф жидкостной, снабженный
градиентной системой насосов и спектрофотометрическим детектором
(предел детектирования $4\bullet10^{-14}$ г/$см^3$.)

Весы аналитические RC 210 фирма "Sartorius" P Δ=0,05 мг

Микрошприц для жидкостной хроматографии фирма "HAMILTON" на $50*10^{-3}$ $см^3$ Δ=0,5 10^{-3} $см^3$

Колбы мерные типа 2-50-2 ГОСТ 1770-74Е
2-100-2 ГОСТ 1770-74Е
2-200-2 ГОСТ 1770-74Е
2-1000-2 ГОСТ 1770-74Е

Пипетка вместимостью 0,2-1,0 $см^3$ BioHit погрешность измерения объема составляет 0,5%, согласно техническому паспорту на пипетку

Цилиндры мерные 2-100 и	2-50	ГОСТ 1770-74
Колба круглодонная на 2 литра	К-1-2000-29/32	ГОСТ 25336-82
Пробирки градуированные с притертыми пробками		
вместимостью 2 - 5- 0,1		ГОСТ 1770-74Е
2-10- 0,1		ГОСТ 1770-74Е
Пипетка 2-2-25		ГОСТ 29169-91
Пипетка 2-2-10		ГОСТ 29169-91

Виала объемом 2 мл № 5182-0544 по каталогу 1976/1997г, фирмы «HEWLETT PACKARD »

3.2. Вспомогательные устройства:

Колонка хроматографическая длиной 250 мм, диаметр 4 мм с фазой ODS (C_{18}) или фазой IP

Шкаф сушильный ШС-80		ТУ 64-1909-74
Баня песчаная		
Плитка электрическая ЭИЧ 1-1,2/220		ГОСТ 1493-83
Иономер И-130		ТУ 25-0511.044-84
Измельчитель тканей РТ-2 (Одесский экспериментальный завод)		
Ступка фарфоровая N 4,5		ГОСТ 9147-73
Гидролизный сосуд № по катологу -240043 фирмы		«BECKMAN» 1988/1989 г.
Фильтры с синей полосой		ТУ 6-09-1678-77
Шпатель двойной		ГОСТ 9147-73
Набор ареометров АОН-1		ГОСТ 18481-81
Набор индикаторной бумаги		ТУ 6-09-1181-76

3.3. Материалы:

Углекислый газ		ГОСТ 8572-73
Азот	осч	ГОСТ 9293-74
Силиконовые шланги, d 4 мм		ТУ 64-1-2813-75

3.4. Реактивы.

Вода дистиллированиая		ГОСТ 6709-72
Перманганат калия	хч	ГОСТ 20490-75
Спирт метиловый	чда	ГОСТ 69965-77
Ацетонитрил для ВЭЖХ		фирма Merk или Sigma
Бария гидроокись	чда	ГОСТ 4107-69
Фосфат натрия Na_2HPO_4	GR	фирма «Sigma »
Спирт этиловый	чда	ТУ 6-09-1710-77 гост 5962
Хлороформ	хч	ГОСТ 3160-51
Диметилформамид для ВЭЖХ		фирма «Sigma »
Сульфат натрия безводный	чда	ГОСТ 4166-76
Бикарбонат натрия $NaHCO_3$	чда	ГОСТ 4275-78
Кислота соляная	осч	ГОСТ 3118-77
Кислота лимонная безводная	GR	фирма «Sigma »
Натрий гидроокись	хч	ГОСТ 4328-77
Диметиламиноазобензосульфонилхлорид (ДАБС реактив)		
$(CH_3)NC_6H_4N$-$NC_6H_4SO_2CL$	GR	фирма «Sigma »

GR-обозначение чистоты реактивов. В переводе, как реактив высокой гарантированной чистоты с содержанием основного вещества не менее 99%.

Набор аминокислот:

Аспарагиновая	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Глютаминовая	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Серин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Треонин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Глицин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Аланин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Аргинин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Пролин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Валин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Метионин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Лейцин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Изолейцин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества

Фенилаланин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Цистеин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Лизин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Гистидин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Тирозин	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества
Триптофан	GR	фирма «Sigma »	99 % содержание основного вещества

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства по точности не уступающие рекомендуемым в методике, а также и реактивы, кроме ацетонитрила, диметилформамида, кислоты соляиой, натрия гидроокиси и ДАБС - реактива.

4. Метод измерения

Метод определение содержания аминокислот в мясных и молочных продуктах основан на первоначальном удалениии липидов и жироподобных веществ путем экстракции их смесью органических растворителей, кислотном гидролизе белков, получении ДАБС–производных аминокислот и их хроматографировании.

В хлебобулочных изделиях и соевых продуктах - гидролиз белков, получение ДАБС–производных аминокислот и их разделение с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение аминокислот происходит в хроматографической колонке длиной 250 мм, диаметром 4,6 мм с фазой ODS (C_{18}) или фазой IP. Для измерения концентрации аминокислот применяется спектрофотометрический детектор с работой в видимой области на длиие волны 436 нм.

5. Требования безопасности

При проведении измерений по данной методике должны выполняться требования следующих документов:

«Основные правила безопасной работы в химических лабораториях » М.: Химия, -1979 г.

Инструкции по эксплуатации жидкостного хроматографа,

Правила техники безопасности при эксплуатации электроустановок, Изд.-2Е, перераб. и доп., М. энергоатоммиздат, 1986, 144 с.

Правила техники безопасности при работе с сосудами под давлением.

6. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальиое образование, изучившие требования безопасности и настоящую методику и прошедшие подготовку для работы в качестве оператора жидкостного хроматографа.

7. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 26703-87 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха - 20 ±5 ^{0}C
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.)
- влажность воздуха не более 80 % при температуре 20 ^{0}C
- напряжение питающей сети 220 ± 22 В
- частота переменного тока 50 ±1 Гц

8. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, получение бидистиллированной воды, приготовление рабочих буферов, реактивов и градуировочных растворов, установление градуировочной характеристики, отбор проб, подготовка к анализу и контроль погрешности измерений.

8.1. Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для детектора и насоса. Прокачивают через колонку смесь буферов в течение 0,5 часа до выхода прибора на режим и стабилизации процессов в колонке. Включают систему регистрации сигналов согласно инструкции по эксплуатации.

8.2. Получение бидистиллированной воды

Собирают обычную установку для дистилляции воды, состоящую из круглодонной колбы (объем 2 литра), водяного холодильника и приемной колбы. В круглодонную колбу наливают 1,5 литра дистиллированной воды, добавляют 10 г $KMnO_4$ и центры кипения. Нагревание воды производят на электрической плитке с закрытой спиралью. Полученную бидистиллированную воду хранят в полиэтиленовых бутылях.

8.2.1.Приготовление буферных растворов и реактивов

Приготовление 1М раствора лимонной кислоты. Взвешивают в химическом стакане объемом 50 $см^3$ 19,2±0,001 г безводной лимонной кислоты. После растворения навески в бидистилированной воде, раствор количественно переносят в мерную колбу на 100 $см^3$ и доводят объем до метки. Раствор хранят в плотно закрытой стеклянной таре. Он стабилен в течение 6 месяцев при комнатной температуре.

Приготовление 3М раствора NaOH. Взвешивают в химическом стакане объемом 50 $см^3$ 12,0±0,001 г гидроокиси натрия, растворяют в небольшом количестве воды. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу на 100 $см^3$ и доводят объем до метки. Раствор хранят в плотно закрытой полиэтиленовой таре. Он стабилен в течение 6 месяцев при комнатной температуре.

Приготовление буфера А. В колбу на 250 $см^3$ приливают цилиндром на 50 $см^3$ 12 $см^3$ 1М раствора лимонной кислоты, затем добавляют 90 $см^3$ бидистиллированной воды (цилиндр на 100 $см^3$) и 10 $см^3$ 3М раствора NaOH (цилиндр на 50 $см^3$). В полученный раствор помещают электрод иономера И-130 в режиме определения pH и титруют раствором 3М NaOH до pH 6,5 ± 0,05.

Буфер А готовят в стакане объемом 1 литр, в который отмеряют 100 $см^3$ титрованного раствора лимонной кислоты с pH 6,5 и приливают 860 $см^3$ бидистиллированной воды и 40 $см^3$ ДМФ (диметилформамида), хорошо перемешивают. Проверяют значение pH полученного буфера и при необходимости корректируют до pH 6,5± 0,05, контроль за pH ведут при помощи иономера. После приготовления буфер переливают в стеклянный бутыль жидкостного хроматографа. Буфер А пригоден для работы в течение 7 дней.

Приготовление буфера Б. Буфер Б готовят в 1 литровой стеклянной бутыли, поставляемой в комплекте с жидкостным хроматографом. Цилиндром отмеряют 300 $см^3$ буфера А, добавляют 672 $см^3$ ацетонитрила и 28 $см^3$ ДМФ. Хорошо перемешивают. Раствор при приготовлении охлаждается, поэтому перед работой ему дают постоять 2 часа для достижения комнатной температуры (20- 25° С). Буфер Б пригоден для работы в течение 7 дней.

Приготовление 0,45% раствора $NaHC0_3$. На аналитических весах взвешивают мерную колбу объемом 100 $см^3$. Затем в ней взвешивают 0,45 г кислого углекислого натрия с точностью ±0,0005 г, в колбу приливают бидистиллированной воды и перемешивают до полного растворения соли. Затем объем доводят водой до метки на колбе.

Приготовление 6М соляной кислоты. Концентрированную соляную кислоту наливают в цилиндр на 100 $см^3$ и замеряют ареометром плотность. По справочной таблице находят процентную концентрацию кислоты.

Определяют массу соляной кислоты для получения 100 г 6М раствора $m = \frac{21.87*100}{c}$, где

m – масса концентрированной соляной кислоты, необходимая для приготовления 100 $см^3$ 6 М раствора, г ;

c – процентная концентрация HCl, найденная по таблице;

21,87 – масса HCl в 100 $см^3$ 6 М соляной кислоты, г.

Затем определяют объем соляной кислоты:

$V = \frac{m}{\rho}$, где

V – объём концентрированной соляной кислоты, необходимый для приготовления 100 $см^3$ 6 М раствора HCl, $см^3$;

ρ - найденная плотность концентрированной соляной кислоты, $г/см^3$.

Отмеряют рассчитанный объем соляной кислоты, переливают в мерную колбу на 100 $см^3$ и доливают бидистиллированной водой до метки.

Приготовление буфера для разбавления ДАБС-производных аминокислот.

В мерной колбе на 100 $см^3$ взвешивают 0,4 ± 0,01 г фосфата натрия, растворяют в бидистиллированной воде объемом 50 $см^3$ и доводят этиловым спиртом до метки. Раствор хранят в плотно закрытой стеклянной таре при комнатной температуре. При этих условиях он стабилен в течение года.

Приготовление раствора ДАБС - реактива. На аналитических весах взвешивают стеклянный стакан на 50 $см^3$. Затем в нём взвешивают навеску диметиламиноазобензосульфонилхлорида (ДАБС - реактив) 0,1 ±0,001 г. В стакан с реактивом приливают 50 $см^3$ ацетонитрила и хорошо перемешивают до полного растворения кристаллов соли диметиламиноазобензосульфонилхлорида, затем переливают раствор в мерную колбу на 100 $см^3$. Стакан несколько раз ополаскивают ацетонитрилом, который сливают в мерную колбу и раствор доводят до метки. Раствор следует хранить в холодильнике в плотно закрытой колбе. Раствор стабилен в течение 6 месяцев.

8.3. Приготовление градуировочных растворов

8.3.1. Приготовление градуировочных растворов смеси 17 аминокислот без триптофана

Раствор А. Перед началом работы подготавливают смесь градуировочных растворов аминокислот с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ каждой. Для этого на аналитических весах взвешивают на часовых стеклах по 25 мг каждой аминокислоты с точностью ±0,05 мг. Затем их количественно переносят в мерную колбу на 1000 $см^3$. В мерную колбу с аминокислотами приливают бидистиллированную воду и встряхивают до полного растворения аминокислот затем доводят до метки. Этот градуировочный раствор аминокислот стабилен при хранении в условиях от 0 до 5 °С в течение шести месяцев.

Раствор Б. Раствор смеси аминокислот с концентрацией $2,5 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ каждой аминокислоты готовят из градуировочной смеси аминокислот (р-р А) с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$. Для этого в мерную колбу на 100 $см^3$ вносят пипеткой 10 $см^3$ раствора аминокислот с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р А) и доводят бидистиллированной водой до метки.

Раствор В. Раствор смеси аминокислот с концентрацией $1,25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ каждой аминокислоты готовят из градуировочной смеси аминокислот (р-р А) с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$. Для этого в мерную колбу на 200 $см^3$ пипеткой отбирают 10 $см^3$ раствора аминокислот с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р А) и доводят бидистиллированной водой до метки.

Раствор Г. Раствор смеси аминокислот с концентрацией $0,625 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ каждой аминокислоты готовят из градуировочной смеси аминокислот (р-р А) с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$. Для этого в мерную колбу на 1000 $см^3$ пипеткой вносят 25 $см^3$ раствора аминокислот с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ и доводят бидистиллированной водой до метки.

8.3.2. Приготовление градуировочных растворов триптофана

Подготавливают градуировочный раствор триптофана с концентрацией $10 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р $А_т$). Для этого на аналитических весах взвешивают на часовом стекле 10 мг аминокислоты с точностью ±0,05 мг и количественно переносят в мерную колбу на 1000 $см^3$. В мерную колбу с аминокислотой триптофан приливают бидистиллированную воду и встряхивают до полного растворения аминокислоты, затем объем доводят до метки. Этот градуировочный раствор триптофана стабилен при хранении в условиях от 0 до 5° С в течение шести месяцев. Раствор триптофана с концентрацией $2,5 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р $Б_т$) готовят из градуировочного раствора с концентрацией $10 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р $А_т$). Для этого в мерную колбу на 1000 $см^3$ вносят 250 $см^3$ раствора триптофана с концентрацией $10 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р $А_т$) и доводят до метки бидистиллированной водой.

Раствор триптофана с концентрацией $1,25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р $В_т$) готовят из градуировочного раствора с концентрацией $10 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р $А_т$). Для этого в мерную колбу на 1000 $см^3$ вносят 125 $см^3$ раствора триптофана с концентрацией $10 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ (р-р А) и доводят бидистиллированной водой до метки.

Для приготовления градуировочных растворов триптофана с концентрациями: 50; 100; 150; 200; 250; .$300 \cdot 10^{-6}$ $мг/см^3$ микрошприцом отбирают аликвотные объемы градуировочных растворов с концентрацией $1,25 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ и $2,5 \cdot 10^{-3}$ $мг/см^3$ по схеме, представленной на следующей странице в в табл.

2. Аликвотные объемы вносят в микропробирки объёмом 1 $см^3$, из которых растворитель удаляют досуха, выдувая азотом и подогревая пробирку.

Затем пробирку закрывают силиконовой пробкой и хранят в морозильной камере при температуре – 18 ^{0}С, аминокислоты стабильны в этих условиях в течение года.

Таблица 2

Схема приготовления градуировочных растворов триптофана для построения градуировочной зависимости

Тип смеси	Концентрация взятой смеси, 10^{-3} мг/$см^3$	Отбираемый объём смеси, $см^3$	Упаривание досуха	Объем градуировочного раствора ДАБС-производной триптофана, $см^3$	Полученная концентрация 10^{-6} мг/$см^3$,	Вводимое в колонку количество ДАБС-производной аминокислоты, 10^{-6} мг
1	2	3	4	5	6	7
$В_т$	1,25	0,02	+	0,5	50,0	1.0
$В_т$	1,25	0,04	+	0,5	100,0	2.0
$Б_т$	2,5	0,03	+	0,5	150,0	3.0
$Б_т$	2,5	0,04	+	0,5	200,0	4.0
$Б_т$	2,5	0,05	+	0,5	250,0	5.0
$Б_т$	2,5	0,06	+	0,5	300,0	6.0

Перед проведением градуировки, предварительно получают ДАБС –производные аминокислоты см.п.8.4.

Приготовление градуировочного раствора триптофана с концентрацией 0,1 мг/$см^3$, необходимого для проведения работ по оценке критерия точности методики, проводят следующим образом:

- на аналитических весах взвешивают навеску 10 мг с точностью 0,1 мг и переносят в мерную колбу на 100 $см^3$, растворяют в бидистиллированной воде и доводят до метки.

8.4. Подготовка к анализу градуировочных растворов аминокислот

Для построения градуировочного графика используются растворы 17 аминокислот с концентрациями: 25; 50; 100; 200; 300 и 400 $\bullet 10^{-6}$ мг/$см^3$. Для их приготовления микрошприцом отбирают аликвотные объемы (растворов Б, В, Г) с концентрацией $1{,}25\bullet10^{-3}$ мг/$см^3$, $2{,}5\bullet10^{-3}$ мг/$см^3$ и $0{,}625\bullet10^{-3}$ мг/$см^3$ по схеме, представленной в табл. 4 и вносят в микропробирку объёмом 1 $см^3$. Затем растворитель удаляют досуха, выдувая слабым потоком азота при подогревании пробирки на песчаной бане при температуре не выше 150 °С. Выдувание растворителя проводят при появлении конденсата на стенках пробирки. После удаления растворителя пробирку закрывают силиконовой пробкой и хранят в морозильной камере при температуре –18 ^{0}С. Аминокислоты стабильны в этих условиях в течение года.

Таблица 3

Схема приготовления градуировочных растворов смеси 17 аминокислот для построения градуировочной зависимости

Тип смеси	Концентрация взятой смеси, 10^{-3} мг/$см^3$.	Отбираемый объём смеси, $см^3$	Упаривание досуха	Объем раствора ДАБС-производных аминокислот, $см^3$	Полученная концентрация аминокислот, 10^{-6} мг/$см^3$	Вводимое в колонку количество ДАБС-производных аминокислот, 10^{-6} мг
1	2	3	4	5	6	7
Г	0,625	0,02	+	0,5	25,0	0,5
В	1,25	0,02	+	0,5	50,0	1,0
Б	1,25	0,04	+	0,5	100,0	2,0
Б	2,5	0,04	+	0,5	200,0	4,0
Б	2,5	0,06	+	0,5	300,0	6,0
Б	2,5	0,08	+	0,5	400,0	8,0

Получение ДАБС –производных аминокислот. В сухую пробирку с градуировочной смесью аминокислот добавляют 0,020 $см^3$ раствора 0,45% водного раствора $NaHCO_3$ и 0,04 $см^3$ 0,1% раствора ДАБС, закрывают силиконовой пробкой. Для получения производных пробирку помещают в водяную баню на 12 минут при температуре 70 ^{0}С. После охлаждения пробирки до комнатной температуры в неё добавляют 0,44 $см^3$ буфера для ДАБС - производных аминокислот. Общий объём в пробирке составляет 0,5 $см^3$. Из этого объема вводят в петлю дозатор хроматографа 0,020 $см^3$. В табл.2 и 3 в столбце 7 приводятся данные по количеству вводимых аминокислот.

8.5. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади хроматографического пика от концентрации каждой аминокислоты в растворе, устанавливают по шести точкам в диапазоне от 25 до $400 \cdot 10^{-3}$ мг/см^3, а для триптофана от 50 до $300 \cdot 10^{-3}$ мг/см^3. Градуировочные растворы хроматографируют не менее пяти раз, начиная с самой низкой концентрации. Регистрация сигнала, обработку и хранение полученной информации проводят с использованием компьютерной системы. Площади пиков стандартов аминокислот вычисляются общепринятыми методами.

Затем на миллиметровой бумаге строится градуировочная зависимость величины отклика детектора (Y) от концентрации каждой аминокислоты (X).

Условия хроматографического анализа:	
Объем вводимой в хроматограф пробы	0,02 см^3
Расход буфера	1,4 см^3/мин
Температура колонки	20 ±5 ^{0}C
Длина волны детектора	436 нм
Шкала чувствительности - нижняя	0.001 ед. абсорбции
Верхняя	0,010 ед. абсорбции
Подвижная фаза	буферы А и Б

Соотношение буферов А и Б представлены в табл.4.

Таблица 4

Условия градиентного элюирования

Время анализа, мин	Соотношение буферов, %		Время, за которое изменяется соотношение буферов, мин.
	А	Б	
0	71	29	13
13	49	51	7
20	14	86	1
30	0	100	0,5
35	71	29	

Время выхода аминокислот устанавливают при проведении градуировочных работ. Для этого наилучшей концентрацией является $50 \cdot 10^{-3}$ мг/см^3 (или $1 \cdot 10^{-6}$ мг каждой аминокислоты, введенной в колонку). Хроматограмма на которой виден порядок выхода аминокислот приводится в приложении 2, рис.1.

8.5.1. Контроль градуировочного графика

Контроль градуировочного графика осуществляется по градуировочным растворам аминокислот. Для контроля должны применяться растворы с концентрацией аминокислот, входящей в диапазон измерений, но не повторяющие по значениям концентрации, по которым рассчитывались параметры градуировочной прямой. Допустимые расхождения между заданными и установленными по графику значениями концентраций используемых для контроля градуировочных растворов не должны превышать 19 %. В противном случае график подлежит повторной перепроверке и при необходимости, новому расчету параметров градуировочной зависимости. График подлежит обязательной проверке при замене партии реактивов и посуды, после ремонта оборудования, но не реже одного раза в месяц.

8.5.2. Оперативный контроль градуировочного графика

Для оперативного контроля градуировочного графика перед началом измерений используется 1-2 градуировочных раствора из диапазона измерений аминокислот. Полученные при хроматографировании значения *Y* не должны отклоняться от градуировочной прямой более чем на величину доверительной границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика $\Delta x_{грвд} = 9$ %. В противном случае график подлежит повторной перепроверке по п.8.5.1.

8.6. Отбор проб, подготовка анализируемых образцов

Отбор проб для исследования проводят согласно НД, регламентирующей анализ показателей качества для соответствующего продукта.

Мясомолочные продукты (колбаса, сыр, мясо) берут в количестве 10 г с погрешностью ± 0,01 г и измельчают на миксере. На взвешенном бумажном фильтре взвешивают навеску пробы 1 ± 0,001 г и промывают 40 $см^3$ смеси хлороформ : метанол в соотношении 2:1 для удаления жира. Затем подсушивают бумажный фильтр в сушильном шкафу при температуре 100 ^{0}С в течение 1 часа, и после остывания фильтра в эксикаторе взвешивают снова с погрешностью ± 0,001 г. Из высушенной пробы берут навеску 0,00130 г с погрешностью ± 0,00005 г и помещают в виалу объемом 2 $см^3$ для гидролиза белка.

Продукты хлебобулочные (хлеб, мука, зерно) и соевые продукты (мука соевая, изолят и концентрат соевый) измельчают в кофемолке до пылевидного состояния, затем навески в количестве 0,00130 г с погрешностью ± 0,00005 г отбирают в виалы объемом 2 $см^3$ для гидролиза.

8.6.1. Кислотный гидролиз продуктов

Отобранные навески проб по п.8.6 заливают 1 $см^3$ 6 М раствора соляной кислоты. Виалы помещают в гидролизный сосуд (см. рис.2, приложение 3), который продувается азотом для удаления следов кислорода. Затем с помощью вакуумного насоса откачивают азот при разрежении не выше 1,35 кПа в течение 5 минут и герметично закрывают гидролизный сосуд. Гидролиз проводят при температуре 110 ^{0}С в течение 24 часов. После гидролиза из пробирок удаляют соляную кислоту, её отдувают азотом при слабом подогревании пробирки на песчаной бане. Температура выпаривания не должна превышать 150 °С.

Далее по п. 8.7.

8.6.2. Щелочной гидролиз продуктов

Щелочной гидролиз проводят для последующего определения аминокислоты триптофан. Для этого из подготовленных по п.8.6 проб продуктов отбирают в виалу объемом 2$см^3$ навеску 0,0100 г с погрешностью ±0,00005г, добавляют 0,2 г ± 0,01 гидроокиси бария и заливают 1$см^3$ бидистиллированной воды. Виалу помещают в гидролизный сосуд, который продувается азотом для удаления следов кислорода. Затем с помощью вакуумного насоса откачивают азот при разрежении не выше 1,35 кПа в течение 5 минут и герметично закрывают гидролизный сосуд. Щелочной гидролиз проводят при температуре 105 ^{0}С в течении 16 часов. После гидролиза содержимое из виалы переливают в пробирки объёмом 5 $см^3$, тщательно обмывают виалу и доводят бидистиллированной водой объём до 5 $см^3$. Для осаждения гидроокиси бария водный раствор продувают углекислым газом в течение 5 минут. Проверяют значение pH индикаторной бумагой, среда должна быть нейтральной. Если среда будет щелочной, пробу еще раз продувают углекислым газом в течение 5 минут и приступают к получению ДАБС-производной. Далее по п. 8.7.

8.7. Получение ДАБС производных аминокислот

В табл. 5 приводится схема разбавления сухого остатка пробы для разных видов продуктов после гидролиза с соляной кислотой и упаривания ее досуха.

Таблица 5

Схема разбавления сухого остатка пробы продуктов после кислотного гидролиза

Название продуктов	Объем разбавления бидистиллированной водой, упаренного гидролизата, $см^3$	Объем разбавленного гидролизата для получения ДАБС производных аминокислот, мкл
Хлебобулочные	2	20
Соевые и мясомолочные	10	20

Из разбавленного гидролизата аминокислот отбирают микрошприцем 0,02 $см^3$ раствора и переносят в микропробирку на 1$см^3$. Этот раствор упаривают досуха, подогревая пробирку, и отдувают слабым потоком азота. После этого добаляют 0,02 $см^3$ раствора $NaHC0_3$ и 0,04 $см^3$ раствора ДАБС- реактива. Для получения производных пробирку помещают в водяную баню на 12 минут при температуре 70 ^{0}С ± 1^{0}С.

После охлаждения пробирки до комнатной температуры в нее добавляют 0,44 $см^3$ буфера для разбавления ДАБС - производных аминокислот. Общий объём пробы составляет 0,5 $см^3$.

9. Выполнение измерений

Подготовленную пробу (объем 0,5 $см^3$) вводят в прибор в количестве 0,02 $см^3$. Анализ проводят при тех же условиях что и калибровку (см. п.8.5). Вычисление площади аминокислот в пробе проводится системой регистрации, обработки и хранения спектрометрической информации.

10. Обработка результатов измерений

Массовую концентрацию каждой аминокислоты в пробе хлебобулочных и соевых продуктов рассчитывают по формуле:

$$C_i = \frac{V_1 * V_3 * X}{M_{probe} * V_2} * 100$$

где:

C_i- концентрация аминокислоты в пробе мг/100 г;
V_1 – объем растворителя в котором растворена проба после гидролиза, $см^3$;(2 или 10)
V_2 – объем растворителя, отборанного для получения ДАБС-производных, $см^3$;(0,02)
V_3 – объем растворителя в котором растворены ДАБС-производные, $см^3$;(0,5)
M_{probe} - навеска пробы г ;(0,0013)
X - концентрация аминокислоты, полученная по градуировочному графику, 10^{-6} мг/$см^3$;
100 – коэффициент пересчета концентрации аминокислоты на 100 г продукта.

Массовую концентрацию каждой аминокислоты в пробе мясо-молочных продуктов рассчитывают по формуле:

$$C_i = \frac{V_1 * V_3 * X * M_2}{M_{probe} * V_2 * M_1} * 100$$

где:

C_i- концентрация амннокислоты в пробе мг/100 г;
V_1 – объем растворителя в котором растворена проба после гидролиза, $см^3$;(10)
V_2 – объем растворителя, отборанного для получения ДАБС-производных, $см^3$;(0,02)
V_3 – объем растворителя в котором растворены ДАБС-производные, $см^3$;(0,5)
M_{probe} - навеска обезжиренной пробы, взятой на гидролиз, г; (0,0013)
M_1 - навеска пробы до обезжиривания, г; (1,0)
M_2 - масса обезжиренной пробы, г;
X - концентрация аминокислоты, полученная по градуировочному графику, 10^{-6} мг/$см^3$;
100 – коэффициент пересчета концентрации аминокислоты на 100 г продукта.

За результат анализа пробы принимают среднее арифметическое из концентраций каждой аминокислоты, найденное в двух параллельных пробах. Вычисление проводят до третьего знака с последующим округлением до второго знака после запятой. Допустимое расхождение между параллейными пробами не должно превышать значения сходимости приведенное в таблицах 10-12 методики.
Гарантированный результат анализа представляют в следующем виде:

$$C_i = C_{ср.} \pm \Delta_{проб.} МВИ \qquad \text{где:} \quad C_{ср.} = \frac{C_{1i} + C_{2i}}{2}$$

$\Delta_{проб.}$ МВИ – относительная суммарная погрешность методики ;
C_{1i} – концентрация аминокислоты в первой пробе;
C_{2i} – концентрация аминокислоты во второй пробе;
$C_{ср.}$ - средняя концентрация аминокислоты, найденная по результатам анализов двух параллельных проб.

11. Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют записью в журнале по форме, приведенной в табл. 6.

Таблица 6

Дата:				Наименование объекта исследований:			
Название аминокислот	M_{probe}	M_1	M_2	V_1	V_2	V_3	C_i
Аспарагиновая							
Глютаминовая							
Серин							
Треонин							
Глицин							
Аланин							
Аргинин							
Пролин							
Валин							
Метионин							
Лейцин							
Изолейцин							
Фенилаланин							
Цистеин							
Лизин							
Гистидин							
Тирозин							
триптофан							

где:

M_{probe} - навеска обезжиренной пробы, взятой на гидролиз, г;

M_1 - навеска пробы до обезжиривания, г; (

M_2 - масса обезжиренной пробы, г

V_1 – объем растворителя в котором растворена проба после гидролиза, $см^3$;

V_2 – объем растворителя, отборанного для получения ДАБС-производных, $см^3$;

V_3 – объем растворителя в котором растворены ДАБС-производные, $см^3$;

Ci – массовая концентрация аминокислоты в пробе (мг/100 г продукта).

12.Контроль погрешности МВИ

Контроль погрешности МВИ осуществляется с целью оперативной информации о качестве измерений рабочих проб и для принятия оперативных мер, предупреждающих ухудшение точности результатов.
В процессе внутреиего оперативного контроля определяются показатели сходимости, воспроизводимости и точности.

12.1. Средства контроля погрешности методики выполнения измерений

В качестве средств контроля в процессе определения показателей качества результатов анализа применяются:
-рабочие пробы для определения показателей сходимости и воспроизводимости;
-рабочие пробы с добавкой при определении показателей точности.

Результаты контроля воспроизводимости и точности фиксируются в соответствии с установленной системой регистрации контроля правильности выполнения измерений, результаты контроля сходимости выполняются для каждого анализа и фиксируются в рабочих журналах исполнителей.

12.2. Порядок проведения контроля сходимости

Контроль сходимости результатов измерений проводится при получении каждого результата измерения, предусматривающего проведение параллельных определений. Контроль сходимости заключается

в сравнении фактической сходимости результатов параллельных определений, полученных при анализе рабочей пробы, с нормативом сходимости – d

Норматив сходимости d смотри в приложении 4, табл. 10-12 .

Сходимость результатов параллельных определений рассчитывается по формулам:

$$d_k = X_{i\max} - X_{i\min}, \qquad d_k(отн)\% = \frac{d_k * 2}{(X_{i\max} + X_{i\min})} \bullet 100, \text{ где}$$

$d_{k\,отн}$ –относительная фактическая сходимость
d_k –фактическая сходимость параллельных определений;
$X_{i\,max}$ –максимальный результат из параллельных измерений;
$X_{i\,min}$ -минимальный результат из параллельных измерений;

Если $d_k отн \geq d$, то сходимость результатов параллельных определений признается неудовлетворительной и анализ повторяется.

12.3. Порядок проведения контроля воспроизводимости

Контроль воспроизводимости результатов измерений проводится не реже 2-3 раз в месяц с использованием рабочих проб. Контроль воспроизводимости обязателен при смене партии реактивов, посуды, после ремонта оборудования, существенных изменений условий выполнения измерений.
Контроль воспроизводимости проводится путем сравнения результата контрольной процедуры D_k, равного расхождению двух результатов измерений – первичного и повторного – содержания аминокислот в одной и той же рабочей пробе с нормативом воспроизводимости D. (приложение 4, табл. 10-12)

Первичный и повторный результат измерений должен быть получен в разных условиях, например, двумя операторами в один день или одним оператором в два последующих дня и т.д.
D_k рассчитывается по формулам:

$$D_k = \overline{X}_1 - \overline{X}_2, \qquad D_k отн.\% = \frac{D_k * 2}{(\overline{X}_1 + \overline{X}_2)} \bullet 100 \qquad \text{где}$$

$D_k отн.$- относительное значение параметра воспроизводимости;

$\overline{X}_1$ - первичный результат измерения рабочей пробы;

$\overline{X}_2$ - повторный результат измерения рабочей пробы.

Величины $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ должны быть получены с соблюдением условий сходимости.

Норматив воспроизводимости D приведен в приложение 4, табл 10-12.

Если $D_k отн. \leq D$, то воспроизводимость контрольных измерений признается удовлетворительной. В этом случае воспроизводимость результатов измерений рабочих проб, полученных в условиях, соответствующих требованиям МВИ, признается удовлетворительной.

В случае превышения норматива воспроизводимости, когда D_kотн. $>D$, контроль повторяют. При повторном превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля воспроизводимости.

12.4. Порядок проведения контроля точности

Контроль точности результатов измерений осуществляется с использованием метода добавок. Образцами для контроля точности являются рабочие пробы и эти же пробы с добавкой градуировочной смеси аминокислот. К пробе с добавкой предъявляются следующие требования:
-добавка должна вводиться в пробу на самой ранней стадии измерений в целях проведения пробы с добавкой через все последующие стадии пробоподготовки и анализа;

Примечание: в целях уменьшения погрешности за счет неоднородности распределения вводимой добавки целесообразно рассчитанное количество добавки вносить непосредственно в подготовленную навеску пробы;
-количество вводимой добавки должно составлять 50-150% от установленного содержания аминокислот в пробе;
-проба с введенной добавкой не должна выходить за верхнюю границу определяемых концентраций аминокислот согласно МВИ.

В качестве добавки используется градуировочная смесь аминокислот с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ мг /см^3 .

Для получения проб с добавкой :

$5 \cdot 10^{-3}$ мг /1,3 мг –берется 0,2 см^3 раствора с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ мг /см^3 ;

$2{,}5 \cdot 10^{-3}$ мг /1,3 мг - берется 0,1 см^3 раствора с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ мг /см^3;

$1{,}25 \cdot 10^{-3}$ мг/1,3 мг - берется 0,05 см^3 раствора с концентрацией $25 \cdot 10^{-3}$ мг /см^3.

Для соевого изолята и всех хлебобулочных изделий применяется добавка $5 \cdot 10^{-3}$ мг/1,3 мг, для соевого концентрата и соевой муки добавка в $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ мг/1,3 мг , для мясомолочных продуктов добавка в $1{,}25 \cdot 10^{-3}$ мг/1,3мг.

Для определения точности анализа триптофана к навеске хлебобулочных продуктов 0,01 г±0,0001 г, а также к навеске колбасы вносится добавка градуировочной смеси триптофана из расчета $10 \cdot 10^{-3}$ мг/10 мг, для мяса $20 \cdot 10^{-3}$ мг/10 мг. Для сыра и всех соевых продуктов вносится добавка из расчета $70 \cdot 10^{-3}$ мг/10 мг. Эту добавку вносят из специально приготовленного раствора триптофана с концентрацией $100 \cdot 10^{-3}$ мг /см^3 . Для получения проб с добавкой триптофана:

$10 \cdot 10^{-3}$ мг в пробу вносится 0,1 см^3 раствора триптофана с концентрацией 100 мкг/см^3 ;

$20 \cdot 10^{-3}$ мг вносится 0,2 см^3 раствора;

$70 \cdot 10^{-3}$ мг вносится 0,7 см^3 раствора триптофана с концентрацией $100 \cdot 10^{-3}$ мг/см^3.

После внесения добавки проба высушивается в токе инертного газа до удаления следов воды, а затем анализируется в соответствии с МВИ.

Контроль точности проводится по результатам измерений пробы до введения добавки ($X_{пр}$) и после введения добавки смеси аминокислот ($X_{пр.доб}$) концентрацией $C_{доб}$ в исходную пробу. Разница ($K_к$) между найденной ($X_{доб} = X_{пр.доб.} - X_{пр}$) и введенной $C_{доб}$ концентрацией добавки не должна превышать по абсолютной величине значения норматива точности K.

Значения $K_к$ и K рассчитываются по формулам:

$$K_к = |X_{пр\ доб} - X_{пр} - C_{доб.}|,$$ где

$K_к$ -- рассчитанный параметр точности;

$X_{пр\ доб}$ –содержание аминокислоты в пробе с добавкой;

$X_{пр}$ –содержание аминокислоты в исходной пробе;

$C_{доб.}$ –концентрация введенной добавки аминокислоты.

K=1,41Δ – для доверительной вероятности P=0,95;

K=1,19Δ –для доверительной вероятности P=0,90, где Δ – погрешность МВИ.

В том случае, когда погрешности определения аминокислоты в исходной пробе и пробе с добавкой различаются более чем на 30%, для расчета норматива точности используется следующая формула:

$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta X_{пр.})^2 + (\Delta X_{пр\ доб})^2}$ - для доверительной вероятности P=0,90;

$K = \sqrt{(\Delta X_{пр})^2 + (\Delta X_{пр\ доб})^2}$ - для доверительной вероятности P=0,95,

где

K –норматив точности;

$\Delta X_{пр.}$ –погрешность определения содержания аминокислоты в исходной пробе;

$\Delta X_{пр\ доб.}$ –погрешность определения содержания аминокислоты в пробе с добавкой.

Если для расчета используются относительные значения погрешностей $\Delta_{отн}$, $\Delta X_{пр\ отн}$, $\Delta X_{пр\ доб\ отн}$, то относительное значение $K_{к\ отн}$ рассчитывается по формуле:

$$K_{\underset{отн}{к}} = \frac{K_к}{C_{доб}},$$

где

$K_к$ –абсолютное значение $K_к$;

$C_{доб}$ –значение добавки введенной в исходную пробу.

Точность контрольных измерений, а также точность результатов измерений рабочих проб, выполненных в условиях соблюдения требований МВИ, признается удовлетворительной, если $|K_к| \le K$.

Если $|K_к| > K$, то точность контрольных измерений признается неудовлетворительной и процедура контроля повторяется с использованием другой рабочей пробы. При повторном получении неудовлетворительных результатов контроля точности, выясняют и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительному контролю:

Метод разработан в Республиканском научно-практическом центре по экспертной оценке качества и безопасности продуктов питания Министерства Здравоохранения РБ.

Разработчики:

Зам.директора по научной работе, д.м.н. Коломиец Н.Д.

Зав.лаборатории физико –химических исследований, к.х.н. Шуляковская О.В.

Ст.н.с. лаборатории физико –химических исследований Жданов Ю.И.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.
(информационное)

Перечень используемой документации

1. ГОСТ 24104-88Е	«Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.»
2. ГОСТ 1550-69	«Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнение для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды. »
3. ГОСТ 1770-74Е	«Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия.»
4. ГОСТ 29227-91	«Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Общие требования.»
5. ГОСТ 23932-90	«Посуда и оборудование лабораторные стеклянные.»
6. ГОСТ 14919-83Е	«Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия.
7. ГОСТ 20490-75	«Калий марганцевокислый. Техническне условия.
ГОСТ 1493-83	Плитка электрическая ЭЙЧ 1-1,2/220. Общие технические условия.
ГОСТ 18481-81	Набор ареометров АОН-1. Общие технические условия.
ГОСТ 69965-77	Спирт метиловый. Общие технические условия.
11. ГОСТ 12026-76	«Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.»
12. ГОСТ 8.207-76	«Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения.»
13. ТУ 25-0511. 44-84	Иономер лабораторный типа И-130.
14. ТУ 25.05.2234-77	Электроды стеклянные лабораторные ЭСЛ-43-07
ГОСТ 9293-74	Азот повышенной чистоты . Общие технические условия.
ТУ 64-1-2813-75	Силиконовые шланги, d 4 мм
ГОСТ 3160-51	Хлороформ. Общие технические условия.
ГОСТ 4166-76	Сульфат натрия безводный. Общие технические условия.
ГОСТ 3118-77	Кислота соляная . Общие технические условия
ГОСТ	Бикарбонат натрия $NaHCO_3$
ГОСТ 4328-77	Натрий гидроокись. Общие технические условия

ПОПРАВЛЕНИЕ

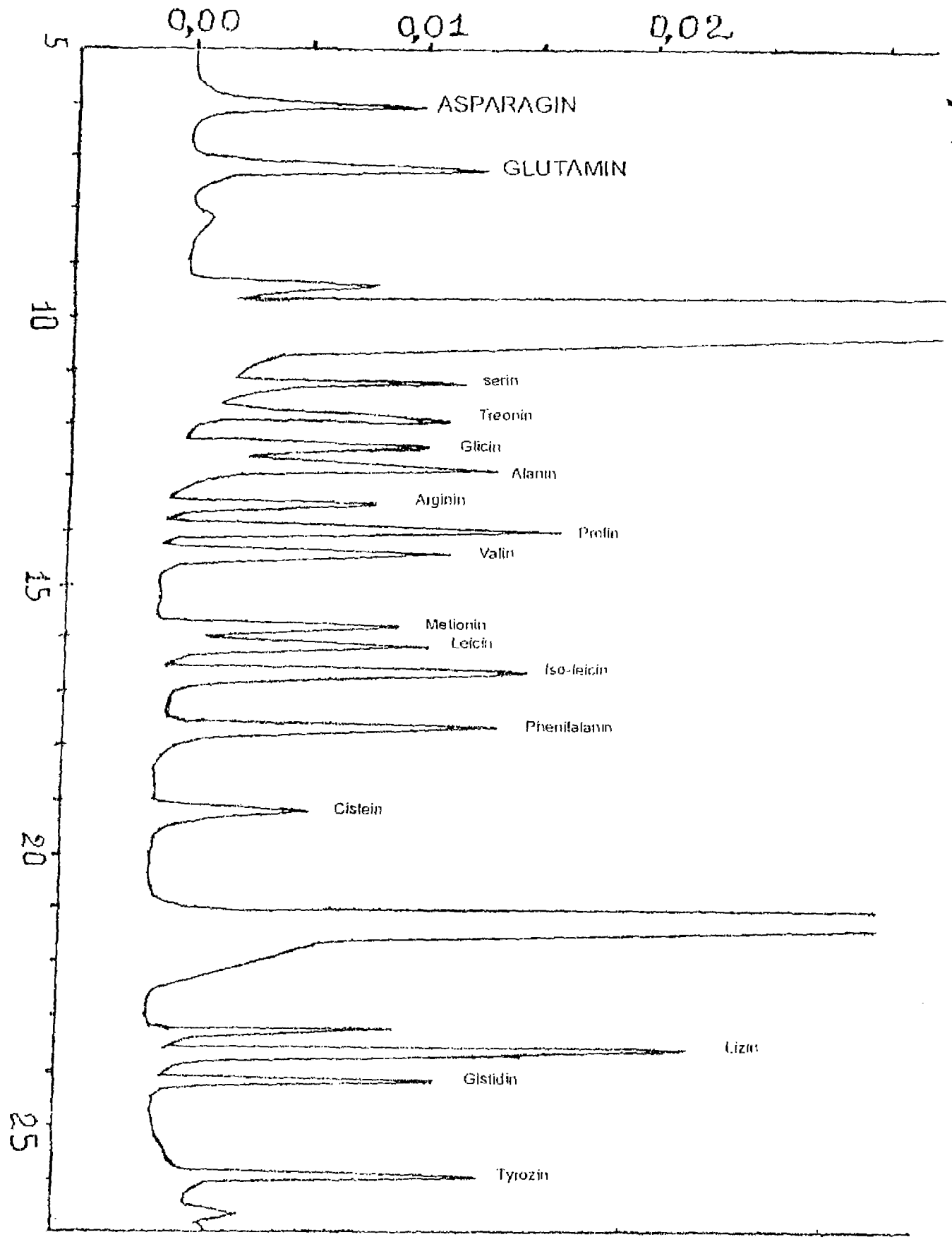

Рис.1.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

Схема гидролизного сосуда.

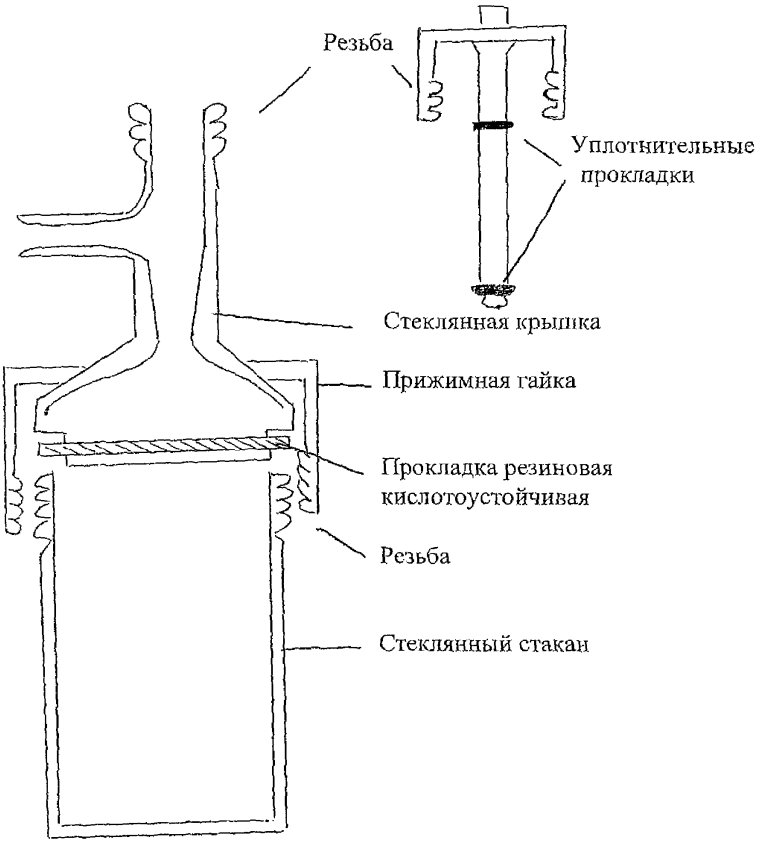

Рис. 2.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.

Таблица 7

Значения точностных параметров методики для хлебобулочных изделий

Название аминокислот	Случайная составляющая погрешности результата определений $S_{уп}$,%	Доверительный интервал случайной составляющей погрешности измерений при n=5 P=0,95, %	Систематическая составляющая погрешности измерений , Θ, %	Относительная погрешность, Δ МВИ, %	Погрешность градуировочного графика $Δ_{гр}$, %	Доверительные границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика $E_{у}$, %
Аспарагиновая	0,91	2,53	23,49	23,49	18,02	7,17
Глютаминовая	0,42	1,17	22,92	22,92	17,40	7,81
Серин	1,02	2,84	23,16	23,16	17,67	8,45
Треонин	1,25	3,78	22,55	22,55	17,00	6,87
Глицин	1,02	2,84	22,31	22,31	16,74	6,33
Аланин	0,81	2,25	22,63	22,63	17,09	7,17
Аргинин	0,83	2,31	22,76	22,76	17,23	7,45
Пролин	0,75	2,08	22,12	22,12	16,53	5,81
Валин	1,03	2,86	22,14	22,14	16,55	5,89
Метионин	5,99	16,65	26,68	26,68	16,33	5,14
Лейцин	0,78	2,17	20,36	20,36	14,54	4,78
Изолейцин	0,70	1,95	22,29	22,29	16,72	6,28
Фенилаланин	0,75	2,09	21,98	21,98	16,37	5,28
Цистеин	2,76	7,67	23,01	23,01	16,55	5,92
Лизин	0,94	2,61	22,12	22,12	16,53	5,75
Гистидин	2,29	6,37	22,09	22,09	16,49	5,56
Тирозин	1,50	4,16	20,33	20,33	14,90	4,25

Таблица 8

Значения точностных параметров методики для мясомолочных изделий

Название аминокислот	Случайная составляющая погрешности результата определений $S_{уп}$, %	Доверительный интервал случайной составляющей погрешности измерений при n=2 P=0,95, %	Систематическая составляющая погрешности измерений ,Θ ,%	Относительная погрешность, Δ МВИ,%
Аспарагиновая	0,81	2,25	23,49	23,49
Глютаминовая	0,80	2,22	22,92	22,92
Серин	0,94	2,61	23,16	23,16
Треонин	0,83	2,31	22,55	22,55
Глицин	0,83	2,31	22,31	22,31
Аланин	1,12	3,11	22,63	22,63
Аргинин	0,83	2,31	22,76	22,76
Пролин	1,06	2,95	22,12	22,12
Валин	0,96	2,67	22,14	22,14
Метионин	1,19	3,31	21,94	21,94
Лейцин	0,86	2,39	20,36	20,36
Изолейцин	0,94	2,61	22,29	22,29
Фенилаланин	1,15	3,20	21,98	21,98
Цистеин	2,64	7,34	22,14	22,14
Лизин	0,73	2,03	22,12	22,12
Гистидин	1,12	3,11	22,09	22,09
Тирозин	1,05	2,92	22,10	22,10
Триптофан	1,86	5,18	20,33	20,33

Таблица 9

Значения точностных параметров методики для продуктов переработки сои

Название аминокислот	Случайная составляющая погрешности результата определений $S_{уп}$,%	Доверительный интервал случайной составляющей погрешности измерений при n=2 P=0,95, %	Систематическая составляющая погрешности измерений, Θ, %	Относительная погрешность, Δ МВИ, %
Аспарагиновая	0,38	1,06	23,56	23,56
Глютаминовая	0,31	0,86	22,99	22,99
Серин	0,60	1,67	23,24	23,24
Треонин	0,66	1,83	22,63	22,63
Глицин	0,96	2,67	22,39	22,39
Аланин	0,66	1,83	22,71	22,71
Аргинин	0,59	1,64	22,84	22,84
Пролин	0,73	2,03	22,20	22,20
Валин	0,68	1,89	22,22	22,22
Метионин	0,66	1,83	22,02	22,02
Лейцин	0,92	2,56	20,45	20,45
Изолейцин	0,68	1,89	22,38	22,38
Фенилаланин	0,64	1,78	22,06	22,06
Цистеин	1,09	3,03	22,22	22,22
Лизин	0,63	1,75	22,20	22,20
Гистидин	0,78	2,17	22,17	22,17
Тирозин	0,86	2,39	22,19	22,19
Триптофан	1,47	4,09	20,33	20,33

Таблица 10

Хлебобулочные продукты

Название аминокислот	Норматив сходимости *d,%*	Норматив воспроизводимости *D, %*	Норматив точности *K, %*
Аспарагиновая	2,52	1,80	33,12
Глютаминовая	1,16	0,83	32,32
Серин	2,82	1,99	32,65
Треонин	3,46	2,44	31,80
Глицин	2,82	1,99	31,46
Аланин	2,24	1,58	31,91
Аргинин	2,30	1,61	32,09
Пролин	2,08	1,47	31,19
Валин	2,85	2,02	31,22
Метионин	16,59	11,66	37,62
Лейцин	2,16	1,52	28,70
Изолейцин	1,94	1,38	31,43
Фенилаланин	2,08	1,47	30,99
Цистеин	7,64	5,46	32,44
Лизин	2,60	1,83	31,19
Гистидин	6,34	3,41	31,15
Тирозин	2,58	1,83	31,16
Триптофан	4,14	1,80	28,66

Таблица 11

Мясомолочные продукты

Название аминокислот	Норматив сходимости *d,%*	Норматив воспроизводимости *D, %*	Норматив точности *K, %*
Аспарагиновая	2,24	1,58	33,12
Глютаминовая	2,22	1,55	32,32
Серин	2,60	1,83	32,65
Треонин	2,30	1,63	31,80
Глицин	2,30	1,63	31,46
Аланин	3,10	2,19	31,91
Аргинин	2,96	2,10	32,09
Пролин	2,94	2,08	31,19
Валин	2,66	1,88	31,22
Метионин	3,30	2,33	30,93
Лейцин	2,38	1,66	28,70
Изолейцин	2,60	1,86	31,43
Фенилаланин	3,18	2,24	30,99
Цистеин	7,31	5,15	31,22
Лизин	2,16	1,52	31,19
Гистидин	3,10	2,22	31,15
Тирозин	2,90	2,05	31,16
Триптофан	5,16	1,72	28,66

Таблица 12.

Соевые продукты

Название аминокислот	Норматив сходимости *d,%*	Норматив воспроизводимости *D, %*	Норматив точности *K, %*
Аспарагиновая	1,05	0,75	33,22
Глютаминовая	0,85	0,61	32,42
Серин	1,66	1,16	32,77
Треонин	1,83	1,30	31,91
Глицин	2,66	1,88	31,57
Аланин	1,83	1,30	32,02
Аргинин	1,91	1,16	32,20
Пролин	2,02	1,44	31,30
Валин	1,88	1,33	31,33
Метионин	2,85	2,02	31,05
Лейцин	2,55	1,80	28,83
Изолейцин	1,88	1,33	31,56
Фенилаланин	1,77	1,27	31,10
Цистеин	3,02	2,13	31,33
Лизин	1,74	1,22	31,30
Гистидин	2,16	1,52	31,26
Тирозин	2,38	1,69	31,29
Триптофан	4,08	1,82	28,66

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора
БелГИМ
В.П. Побко
"__" 2000 г.

ЭКСПЕРТНОЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

на методику
по определению аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, разработанную РНПЦ по экспертной оценке качества и безопасности продуктов питания

В результате проведения метрологической экспертизы установлено:

1 Представленная методика предназначена для определения концентрации аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2 Методика соответствует требованиям ГОСТ 8.010-90.

3 Методика может быть использована для определения концентрации аминокислот в продуктах питания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Начальник отдела испытаний пищевой и сельскохозяйственной продукции Г.В. Артеменко

gost.e-ecolog.ru