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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 15914— 2016

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Ферментативный метод определения содержания общего крахмала

(ISO 15914:2004, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт кормов имени В.Р. Вильямса (ФГБНУ «ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (от 25 мая 2016 г. № 88-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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 сентября 2016 г. № 1253-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 15914—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 15914:2004 «Корма для животных. Ферментативный метод определения содержания общего крахмала» («Animal feeding stuffs — Enzymatic determination of total starch content», IDT).

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

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сущность метода 2
5 Реактивы 2
6 Оборудование, посуда и вспомогательные материалы 3
7 Приготовление анализируемой пробы 4
8 Проведение анализа 4
9 Обработка и выражение результатов 6
10 Прецизионность 6
11 Протокол испытаний 7
Приложение А (справочное) Отдельные примечания к ходу проведения анализа 8
Приложение В (справочное) Результаты межлабораторных испытаний 9
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 10
Библиография 11

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Ферментативный метод определения содержания общего крахмала

Animal feeding stuffs. Enzymatic determination of total starch content

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает ферментативный метод определения содержания общего крахмала в кормах для животных и в сырье для их производства.

Метод также применим для установления наличия примесей в крахмале.

В анализируемой пробе не должно содержаться компонентов, которые обладают абсорбцией при длине волны 340 нм.

Аналитический диапазон метода определения общего крахмала в анализируемой пробе от 40 до 1000 г/кг. Диапазоны содержания от 200 до 1000 г/кг и от 40 до 200 г/кг крахмала определяются по различным стандартным растворам глюкозы. В случае содержания крахмала в анализируемой пробе в диапазоне от 40 г/кг до 200 г/кг применяется другая процедура разбавления стандартного раствора глюкозы и проб.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая его изменения).

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

ISO 6498:2012 Animal feeding stuffs — Guidelines for sample preparation (Корма для животных. Руководящие указания по приготовлению проб для испытания)[1)]

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **крахмал** (starch): Натуральный растительный полимер, состоящий из длинных неразветвленных цепей 1,4-α-D-глюкозных единиц (амилоза) и/или длинных α-1,6-разветвленных цепей α-1,4-связанных глюкозных единиц (амилопектин).

3.2 **содержание крахмала** (starch content): Массовая доля крахмала и высокомолекулярных продуктов его распада, нерастворимых в 40 %-ном этаноле, определенная в соответствии с методом, установленным в настоящем стандарте.

Примечание — Содержание крахмала выражается в граммах на килограмм.

[1)] Действует взамен ISO 6498:1998 Animal feeding stuffs. Preparation of test samples.

Издание официальное

4 Сущность метода

Размолотую анализируемую пробу экстрагируют 40 %-ным этанолом для удаления растворимых сахаров. После удаления сахаров остаток анализируемой пробы для экстракции и растворения в ней крахмала обрабатывают водным раствором диметилсульфоксида (ДМСО) (объемная доля 90 %) при температуре 100 °С, затем концентрированной соляной кислотой при температуре 60 °С.

Растворенный и разжиженный крахмал количественно превращается в глюкозу с помощью фермента амилоглюкозидазы. Количество образовавшейся глюкозы определяют гексокиназным методом [1], [2].

5 Реактивы

Используют реактивы установленной аналитической чистоты.

5.1 Вода чистотой не менее 3-й степени по ISO 3696.

5.2 Этанол (C_2H_5OH) объемной долей 40 %.

Этанол объемом 417 см^3 (объемная доля 96 %) разбавляют водой до 1000 см^3.

5.3 Соляная кислота, c(HCl) = 12 моль/дм^3.

5.4 Водный раствор гидроксида натрия, c(NaOH) = 4 моль/дм^3.

В химическом стакане растворяют 40 г гидроксида натрия в 50 см^3 воды. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3 и его объем доводят до метки водой.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Выделяется тепло. Необходимо проводить растворение в защитных очках.

5.5 Раствор уксусной кислоты, $c(CH_3COOH)$ = 2 моль/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят 200 см^3 воды, затем 59 см^3 ледяной уксусной кислоты. Доводят объем раствора в колбе до метки водой.

5.6 Раствор уксуснокислого натрия, $c(CH_3COONa)$ = 2 моль/ дм^3.

В мерной колбе вместимостью 500 см^3 растворяют в воде 82,0 г уксуснокислого натрия и разбавляют раствор до метки водой.

5.7 Буфер уксуснокислого натрия, $c(CH_3COONa/H)$ = 2 моль/дм^3, pH = 4,8 ед. pH.

Смешивают 41 см^3 раствора уксусной кислоты (5.5) 59 см^3 раствора уксуснокислого натрия (5.6). Проверяют значение pH на pH-метре и, при необходимости, устанавливают требующееся значение pH, пользуясь раствором уксусной кислоты или уксуснокислого натрия.

Ежедневно готовят свежий буферный раствор.

5.8 Диметилсульфоксид (ДМСО), объемной долей 90 %.

Смешивают ДМСО и воду в объемном соотношении 9:1.

5.9 Осветляющие растворы по Каррезу

5.9.1 Раствор железистосинеродистого калия (II), $c[K_4Fe(CN)_6]$ = 0,25 моль/дм^3.

В мерной колбе вместимостью 1 дм^3 растворяют в воде 106 г трехводного железистосинеродистого калия (II) [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$]. Доводят объем раствора до метки водой.

5.9.2 Раствор уксуснокислого цинка в 0,5 моль/дм^3 уксусной кислоты, $c[Zn(CH_3CO_2)_2]$ = 1 моль/дм^3.

В мерной колбе вместимостью 1 дм^3 растворяют в воде 219,5 г двуводного уксуснокислого цинка [$Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot 2H_2O$] и 30 г ледяной уксусной кислоты. Доводят объем раствора до метки водой.

5.10 Раствор йода в йодистом калии

В мерной колбе вместимостью 1 дм^3 растворяют в воде 12,7 г йода (I_2) и 24,0 г йодистого калия (KI). Доводят объем раствора водой до метки. Перед использованием полученный раствор разбавляют в 10 раз.

5.11 Стандартный раствор глюкозы

5.11.1 Стандартные растворы глюкозы, используемые при анализе проб, содержащих крахмал в пределах 200—1000 г/кг

Готовят три стандартных раствора глюкозы c [$C_6H_{12}O_6$] = 0,0194 моль/дм^3. В каждой мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют в воде (350 ± 1) мг безводной глюкозы, взвешенной с точностью 1 мг. Доводят объем раствора до метки водой.

5.11.2 Стандартные растворы глюкозы, используемые при анализе проб, содержащих крахмал в пределах 40—200 г/кг

Готовят три стандартных раствора глюкозы $c[C_6H_{12}O_6] = 0{,}0039$ моль/дм^3. В каждой мерной колбе вместимостью 500 см^3 растворяют в воде (350 ± 1) мг безводной глюкозы. Доводят объем раствора до метки водой.

Ежедневно готовят свежие стандартные растворы глюкозы.

5.12 Раствор амилоглюкозидазы (АМГ), 160 единиц/см^3

Амилоглюкозидазу (АМГ) массой 267 мг [EC 3.2.1.3 (Aspergillus niger, Roche Diagnostics, No 1202367, 6 U/mg)][1)] растворяют в смеси 9 см^3 воды и 1 см^3 буфера уксуснокислого натрия (5.7). При хранении и использовании фермента необходимо тщательно соблюдать рекомендации производителя.

Если используется другой фермент, следует учитывать его активность, как указано в примечании. В этом случае необходимую массу фермента, достаточную для разложения крахмала, определяют в соответствии с его активностью.

Примечание — Различные поставщики фермента используют различные обозначения единиц активности фермента. В настоящем стандарте использовано следующее обозначение единицы активности фермента АМГ — 1 единица амилоглюкозидазы, способная выделять 1 мкмоль глюкозы из гликогена за 1 мин при 25 °С и pH = 4,75 ед. 10 см^3 раствора фермента достаточно для 75 определений.

5.13 Набор реактивов для определения концентрации D-глюкозы ферментативным гексокиназным УФ-методом (R-Biopharm, No. 716251)[2)]. Согласно инструкции производителя неиспользованные наборы можно хранить в течение года при температуре 4 °С. Реактивы, включенные в набор и их приготовление при проведении анализов по 5.13.1 и 5.13.2.

5.13.1 Раствор буфер/субстрат (склянка 1)

Содержимое склянки 1 растворяют в 45 см^3 воды. Реактив хранят в при температуре 4 °С в темном месте в течение не более четырех недель и используют при комнатной температуре.

5.13.2 Раствор фермента (склянка 2)

Раствор готов для использования.

5.13.3 Окрашивающий раствор

Смешивают 22,5 см^3 раствора буфер/субстрат (5.13.1) с 95 см^3 воды и 0,45 см^3 раствора фермента (5.13.2) и гомогенизируют. Полученное количество раствора достаточно для проведения приблизительно 40 измерений. Используют только свежеприготовленные окрашивающие растворы при комнатной температуре.

6 Оборудование, посуда и вспомогательные материалы

6.1 Аналитические весы с точностью взвешивания 0,1 мг.

6.2 Центрифуга с ускорением (180 ± 10) *g* и 3000 *g*, подходящая для пробирок с завинчивающимися крышками вместимостью 12 см^3 (значение *g* дается на дне пробирки).

6.3 Водяная баня, поддерживающая температуру (100 ± 2) °С.

6.4 Водяная баня, поддерживающая температуру (60 ± 1) °С.

6.5 pH-метр градуированный с комбинированным стеклянным электродом точностью измерения 0,01 ед. pH.

6.6 Микропипетки градуированные с регулируемым объемом раствора: 40—200 мкдм^3, 200—1000 мкдм^3, 1—5 см^3 и дозатор с регулируемым объемом раствора 1—5 см^3.

6.7 Спектрометр с проточной кюветой, позволяющий проводить измерения при длине волны 340 нм.

6.8 Ротационный шейкер с частотой вращения 50 об/мин для центрифужных пробирок с завинчивающимися крышками (6.11).

6.9 Дозатор/разбавитель Hook&Tucker Compudil D[3)].

6.10 Сушильный шкаф с принудительной вентиляцией воздуха.

6.11 Стеклянные центрифужные пробирки, 100 × 16 мм, с завинчивающимися крышками, подходящими к резиновым пробкам, покрытым фторопластом.

[1)] Roche Diagnostics No. 1202367 является примером имеющегося в продаже подходящего продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта.

[2)] R-Biopharm AG No. 716251 является примером имеющегося в продаже подходящего продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта.

[3)] Hook&Tucker Compudil D является примером имеющегося в продаже подходящего продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта.

6.12 Мерные колбы вместимостью 100 см^3 широкогорлые, снабженные притертым стеклянным соединением 14/23, позволяющие измерять значение pH раствора в колбе комбинированным стеклянным электродом.

6.13 Мешалка для пробирок (Vortex mixer[1)]) для альтернативного метода разложения и растворения крахмала по 8.4.2.

6.14 Шейкерная водяная баня, поддерживающая температуру (100 ± 2) °С, с длиной хода 2 см, частотой колебаний 150—200 раз в минуту. Водяная баня должна быть снабжена штативом, чтобы пробирки размещались в воде в горизонтальном положении.

6.15 Стеклянные центрифужные пробирки вместимостью не менее 20 см^3 с завинчивающимися насадками, подходящими к резиновым пробкам, покрытым фторопластом.

6.16 Стеклянные шарики диаметром 3 мм.

7 Приготовление анализируемой пробы

Анализируемую пробу готовят в соответствии с ISO 6498.

8 Проведение анализа

8.1 Анализируемая проба

Анализы выполняют в двукратной повторности.

Взвешивают около 200 мг анализируемой пробы (Раздел 7) в центрифужной пробирке (6.11). Во второй центрифужной пробирке взвешивают вторые 200 мг как дубликат подготовленной пробы (Раздел 7).

Анализируют пробы в каждой пробирке.

8.2 Экстракция сахаров

В каждую пробирку добавляют 10 см^3 этанола (5.2). Экстрагируют растворимые сахара путем непрерывного встряхивания суспензии в течение 10 мин на ротационном шейкере (6.8). Затем центрифугируют в течение 10 мин на центрифуге (6.2) с радиальным ускорением (180 ± 10) *g* и удаляют надосадочную жидкость. Экстракцию проводят дважды.

8.3 Холостая проба

Начиная с этой стадии в каждой серии анализов выполняют холостое определение, которое включает все стадии анализа, кроме взятия навески анализируемой пробы в пробирку.

8.4 Разложение крахмала

8.4.1 Общее

Разложение и растворение крахмала можно выполнить двумя способами (8.4.2 — способ 1 или 8.4.3 — способ 2). При проведении анализа по 8.4.3 анализируемую пробу помещают в стеклянную центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой, вместимостью не менее 20 см^3 (6.15).

8.4.2 Проведение анализа 1

В пробирку с анализируемой пробой при непрерывном перемешивании на мешалке для пробирок (6.13) дозатором добавляют 10 см^3 ДМСО (5.8) и продолжают перемешивать до получения свободной от комочков суспензии. Пробирку закрывают завинчивающейся крышкой.

Примечание — Энергичная гомогенизация при добавлении ДМСО необходима для предотвращения образования микрогеля и/или комочков. Образование микрогеля и комочков приводит к получению ошибочного результата анализа, главным образом, заниженного, в связи с неполным гидролизом крахмала ферментом АМГ.

После гомогенизации пробирку немедленно вставляют в ротационный шейкер (6.8) и помещают на 30 мин в сушильный шкаф при температуре 100 °С для расщепления крахмала. Пробирку охлаждают, после чего пипеткой (6.6) добавляют 1,7 см^3 концентрированной соляной кислоты (5.3), тщательно перемешивают. Пробирку закрывают и помещают в ротационный шейкер. Для частичного гидролиза пробы пробирку ставят в сушильный шкаф (6.10) при непрерывном встряхивании в течение 30 мин при температуре 60) °С.

Далее анализ выполняют по 8.4.4.

[1)] Vortex mixer является примером имеющегося в продаже подходящего продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта.

8.4.3 Проведение анализа 2

В остаток в стеклянной центрифужной пробирке (6.15) помещают 15 стеклянных шариков (6.16). В пробирку с помощью раздаточного устройства/разбавителя, при непрерывном перемешивании на мешалке (6.13), добавляют 10,0 см^3 водного ДМСО до получения суспензии без комочков. Пробирку закрывают завинчивающейся крышкой.

Примечание — Энергичная гомогенизация при добавлении ДМСО необходима для предотвращения образования микрогеля и/или комочков. Микрогель и комочки приводят к ошибочному результату определения содержания крахмала.

Пробирку помещают в штативе в горизонтальном положении в кипящую водяную баню (6.14) и встряхивают в течение 30 мин. После охлаждения в нее пипеткой (6.6) добавляют 1,7 см^3 концентрированной соляной кислоты (5.3) и тщательно перемешивают. Пробирку закрывают и помещают в водяную баню при температуре (60 ± 1) °С, встряхивают в течение 30 мин. При этом происходит частичный гидролиз крахмала. Далее анализ выполняют по 8.4.4.

8.4.4 Регулирование значения pH

Пробирку охлаждают и ее содержимое переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 (6.12). Добавляют 5 см^3 водного раствора гидроксида натрия (5.4) и 2,5 см^3 буфера уксуснокислого натрия (5.7), раствор гомогенизируют. Измеряют значение pH раствора на pH-метре (6.5). При необходимости значение pH устанавливают до (4,8 ± 0,1) ед. pH разбавленной соляной кислотой или гидроокисью натрия. Смывают раствор и приставшие с ним частички пробы с электродов pH-метра водой в ту же мерную колбу и доводят объем раствора до метки водой.

8.5 Ферментативное разложение крахмала в глюкозу

Сразу после гомогенизации пипеткой (6.6) переносят 5,00 см^3 (этот объем в формуле расчета содержания крахмала по 9.2 соответствует объему, обозначенному как V_1) гомогенизированного раствора расщепленного и частично разложенного крахмала (8.4.4) в чистую и сухую стеклянную пробирку (6.11). Пипеткой (6.6) добавляют 0,125 см^3 раствора фермента АМГ (5.12). Закрывают пробирку завинчивающейся крышкой и тщательно гомогенизируют. Раствор инкубируют в водяной бане при температуре 60 °С в течение времени не менее 16 ч. Для инактивации АМГ пробирку помещают в кипящую водяную баню на 15 мин. Пробирку охлаждают до комнатной температуры и добавляют пипеткой 0,125 см^3 раствора железистосинеродистого калия (5.9.1) и встряхивают в течение 1 мин. Добавляют пипеткой 0,125 см^3 раствора уксуснокислого цинка (5.9.2) и снова встряхивают в течение 1 мин. В пробирке содержится 5,375 см^3 раствора (который равен V_2 при расчетах в 9.2). Затем центрифугируют в течение 10 мин с радиальным ускорением не менее 3000 *g*. Надосадочную жидкость переносят в чистую и сухую пробирку.

Для проверки полноты гидролиза крахмала в центрифужную пробирку добавляют несколько см^3 воды, кипятят в течение 10 мин, охлаждают и вносят 0,2 см^3 раствора йода. Голубая окраска показывает наличие крахмала, что означает его неполное разложение. В случае наличия крахмала анализ данной пробы повторяют (см. 8.1).

8.6 Ферментативное определение содержания глюкозы

8.6.1 Пробы с содержанием крахмала 200—1000 г/кг

В отдельные чистые сухие пробирки помещают по 0,5 см^3 каждого из растворов гидролизованного крахмала (8.5), холостой пробы (8.3), три стандартных раствора глюкозы (5.11.1) и воду (5.1). В пробирки с помощью дозатора/разбавителя (6.9) приливают по 9,5 см^3 воды (5.1) и гомогенизируют.

8.6.2 Пробы с содержанием крахмала 40—200 г/кг

Отбирают пипеткой по 0,5 см^3 растворов гидролизованного крахмала (8.5), холостой пробы (8.3), трех стандартных растворов глюкозы (5.11.2) и воды (5.1) в отдельную чистую сухую пробирку. Отобранные растворы разбавляют при помощи дозатора/разбавителя (6.9) с 1,5 см^3 воды (5.1) и гомогенизируют.

Если ожидается низкое содержание крахмала (менее 200 г/кг), для повышения чувствительности определения используют другое соотношение разбавления для ферментативного гидролиза крахмала в глюкозу. Такое же разбавление необходимо соблюдать и для холостой пробы.

Готовят стандартные растворы глюкозы сравнительно более низкой концентрации и разбавляют стандартные растворы так же, как и растворы анализируемой и холостой проб.

Колориметрические измерения холостой пробы (8.3), воды (5.1) и трех стандартных растворов глюкозы проводят дважды. Анализируемые пробы, содержащие гидролизованный крахмал, измеряют один раз.

Пипеткой (6.6) переносят по 0,4 см^3 разбавленных растворов анализируемой пробы, холостой пробы, разбавленных стандартных растворов глюкозы и воды в чистые сухие центрифужные пробирки.

В пробирки пипеткой (6.6) добавляют 2,62 см^3 окрашивающего раствора (5.13.3) и тщательно перемешивают. Измеряют абсорбцию (см. 6.7) раствора при длине волны 340 нм относительно воды.

9 Обработка и выражение результатов

9.1 Градуировочный график

Вычисляют значение абсорбции для каждого их трех стандартных растворов глюкозы (E_{1gs}), для чего из значения абсорбции стандартного раствора глюкозы, полученного на приборе (E_{0gs}), вычитают значение абсорбции окрашенной воды (E_{0wb}), по формуле

$$E_{1gs} = (E_{0gs} - E_{0wb}). \quad (1)$$

Значение абсорбции неокрашенной воды (по определению) равно нулю.

Используя линейный регрессионный анализ, строят градуировочный график для значений абсорбции против содержания глюкозы в неразбавленных стандартных растворах глюкозы (в г/дм^3).

Вычисляют значение абсорбции раствора анализируемой пробы (E_{1s}), для чего из значения абсорбции раствора пробы, полученного на приборе (E_{0s}), вычитают значение абсорбции раствора холостой пробы (E_{0sb}) по формуле

$$E_{1s} = (E_{0s} - E_{0sb}). \quad (2)$$

Используя градуировочный график, (9.1), вычисляют содержание глюкозы (ρ) в неразбавленных растворах пробы (8.5), г/ дм^3.

Смотреть приложение А.

9.2 Вычисление содержания крахмала

Содержание крахмала в анализируемой пробе w_s, г/кг, вычисляют по формуле

$$w_s = \frac{\rho_g \frac{100}{V_1} V_2 \cdot 0{,}9}{m_0}, \quad (3)$$

где ρ — содержание глюкозы в растворе пробы, вычисленное в соответствии с 9.1, г/дм^3;

V_1 — объем раствора крахмала в 8.5, взятого для гидролиза (5,00 см^3);

V_2 — общий объем раствора после ферментативного гидролиза крахмала в глюкозу в 8.5, равный 5,375 см^3;

m_0 — масса анализируемой пробы, г.

Для вычисления содержания крахмала по вышеприведенной формуле необходимо, чтобы были использованы соответствующие разбавления растворов пробы в 8.6.1 и стандартных растворов глюкозы в 5.11.

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторные испытания

Подробности межлабораторных испытаний по определению прецизионности метода приводятся в приложении В. Значения, полученные в межлабораторных испытаниях, не применимы для других диапазонов концентрации и матриц, отличающихся от приведенных.

10.2 Повторяемость

Абсолютная разница между двумя независимыми единичными результатами испытания, полученными с использованием одного и того же метода, на идентичном анализируемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором на одном и том же оборудовании в течение короткого интервала времени, не должна превышать более чем в 5 % случаев предел повторяемости:

- 14 г/кг для гороха, комбикорма молочного скота и тапиоки;
- 17 г/кг для корма поросят;
- 48 г/кг для корма кур-несушек (см. приложение В).

10.3 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя независимыми единичными результатами испытания полученными с использованием одного и того же метода на идентичном анализируемом материале в разных

лабораториях различными операторами на различном оборудовании в течение короткого интервала времени, не должна превышать более чем в 5 % случаев предел воспроизводимости:

- 25 г/кг для корма поросят;
- 34 г/кг для тапиоки;
- 36 г/кг для комбикорма молочного скота;
- 48 г/кг для корма кур-несушек;
- 50 г/кг для гороха (см. приложение В).

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен включать:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- использованный метод отбора проб, если он известен;
- использованный метод анализа со ссылкой на настоящий стандарт;
- все подробности анализа, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, вместе с подробностями любых случайностей, которые могли оказать влияние на результат(ы) анализа;
- полученный результат анализа или два результата анализа, если контролировалась повторяемость.

Приложение А
(справочное)

Отдельные примечания к ходу проведения анализа

А.1 Градуировочная кривая, построенная по результатам трехкратного измерения холостого и стандартного растворов, более достоверна, чем кривая, построенная на результатах однократного измерения холостого и пяти градуировочных растворов различных концентраций [5].

А.2 Для получения точных результатов анализируемая проба не должна содержать компонентов, которые обладают абсорбцией или абсорбцией в условиях проведения анализа при длине волны 340 нм. Поэтому при анализе неизвестных проб следует контролировать отсутствие в них таких компонентов следующим способом.

По 0,4 $см^3$ подготовленных по 8.6.1 растворов анализируемой пробы и холостой пробы пипеткой переносят в стеклянные пробирки. В пробирки прибавляют 2,6 $см^3$ окрашивающего раствора, приготовленного без добавления раствора фермента.

Через 30—60 мин измеряют абсорбцию растворов при длине волны 340 нм. Разница в абсорбции между растворами анализируемой и холостой проб не должна превышать 0,002 единицы абсорбции. Для анализа проб, у которых эта разница выше, метод не применим. Пробы, исследованные при разработке настоящего стандарта, — пробы кормов для животных, зерен злаков (кукурузы, пшеницы), лебеды и лиофильно-высушенной картофельной мезги удовлетворяли этому условию.

Приложение В
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Межлабораторные испытания проводились в 1998 г. в соответствии с [4]. Участвовало двенадцать лабораторий. Изучались пробы обезвоженной тапиоки, корма для кур-несушек, зерна гороха, корма для поросят и комбикорма для молочного скота. Показатели прецизионности приводятся в таблице В.1.

Т а б л и ц а В.1 — Статические результаты межлабораторного исследования

	Проба				
	1	2	3	4	5
Количество лабораторий после удаления выбросов Количество принятых результатов	9 18	10 20	9 18	8 16	10 20
Среднее содержание крахмала, г/кг	456	447	233	704	394
Стандартное отклонение повторяемости s_r, г/кг Коэффициент вариации повторяемости, % Предел повторяемости r, $2{,}8 \cdot s_r$, г/кг	5 1,1 14	6 1,3 17	5 2,1 14	5 0,7 14	17 4,3 48
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, г/кг Коэффициент вариации воспроизводимости, % Предел воспроизводимости R, $2{,}8 \cdot s_R$, г/кг	18 3,9 50	9 2,0 25	13 5,6 36	12 1,7 34	17 4,3 48
Пробы: 1 — зерно гороха; 2 — корм для поросят; 3 — корм для молочного скота; 4 — тапиока, обезвоженная; 5 — корм для кур-несушек.					

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ISO 3696:1987	IDT	ГОСТ ИСО 3696—2013 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»
ISO 6498:2014	IDT	ГОСТ ISO 6498—2014 «Корма, комбикорма. Подготовка проб для испытаний»
Примечание — В настоящем стандарте использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов: - IDT — идентичные стандарты.		

Библиография

[1] Brunt K., Sanders P. and Rozema T. The enzymatic determination of starch in food, feed and raw materials of the starch industry. Starch/Stärke, 50, 1998, pp. 413—419

[2] Method of enzymatic bioanalysis and food analysis. Boehringer Mannheim, 1995, pp. 46—49 and 126—129

[3] ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions [Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы определений]

[4] ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method [Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения]

[5] Miller J. C. and Miller J. N. Statistics for analytical chemistry, 2nd edition, 1992, pp. 112—115, Ellis Horwood, New York, London, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore

[6] Brunt K., Sanders P. and Rozema T. The enzymatic determination of starch in food, feed and raw materials of the starch industry. Starch/Stärke, 50, 2000, pp. 73—75

УДК 633.1001.4:006.354 МКС 65.120 IDT

Ключевые слова: корма, крахмал, ферментативный метод, фотометрия, амилоглюкозидаза, гексокиназа

Редактор *Е.В. Костылева*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 03.10.2016. Подписано в печать 10.10.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68. Тираж 31 экз. Зак. 2469.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru