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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 13496.21— 2015

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Методы определения лизина и триптофана

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП»)

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 августа 2015 г. № 79-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 октября 2015 г. № 1443-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 13496.21—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 ВЗАМЕН ГОСТ 13496.21—87

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

© 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 Требования техники безопасности 2
4 Условия проведения испытаний 3
5 Требования к квалификации оператора 3
6 Отбор проб 3
7 Подготовка проб 3
8 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на аминокислотном анализаторе 3
9 Метод тонкослойной хроматографии в фиксированном слое ионообменника 7
10 Колориметрический метод определения содержания триптофана с *n*-парадиметиламинобензальдегидом 11
11 Контроль точности результатов испытаний 13
12 Оформление результатов испытаний 14
13 Оформление протокола испытаний 14

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Методы определения лизина и триптофана

Feeds, mixed feeds and raw material.
Methods for determination of lysine tryptophane

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, комбикорма и комбикормовое сырье и устанавливает два хроматографических метода определения лизина и триптофана (высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением аминокислотного анализатора и тонкослойной хроматографии в фиксированном слое ионообменника) и колориметрический метод определения триптофана.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.2.007.0—75 Система стандартов безопасности труда. Изделия электротехнические. Общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 83—79 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

Издание официальное

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия
ГОСТ 3652—69 Реактивы. Кислота лимонная моногидрат и безводная. Технические условия
ГОСТ 4107—78 Реактивы. Бария гидроокись 8-водная. Технические условия
ГОСТ 4197—74 Реактивы. Натрий азотистокислый. Технические условия
ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия
ГОСТ ИСО 5725-1—2003* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения
ГОСТ ИСО 5725-2—2003** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений
ГОСТ ИСО 5725-6—2003*** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике
ГОСТ 5962—2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия
ГОСТ ISO 6498—2014 Корма, комбикорма. Подготовка проб для испытаний
ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
ГОСТ 9805—84 Спирт изопропиловый. Технические условия
ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 13496.0—80*[4] Комбикорма, сырье. Методы отбора проб
ГОСТ 13586.3—83 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб
ГОСТ 13979.0—86 Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб
ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия
ГОСТ 17681—82 Мука животного происхождения. Методы испытаний
ГОСТ 22280—76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия
ГОСТ 23519—93 Фенол синтетический технический. Технические условия
ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 27262—87*[4] Корма растительного происхождения. Методы отбора проб
ГОСТ 27668—88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб
ГОСТ 28178—89 Дрожжи кормовые. Методы испытаний
ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

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 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 ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Требования техники безопасности

3.1 При выполнении испытаний необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроприборами по ГОСТ 12.1.019 и ГОСТ 12.2.007.0, а также требования, изложенные в технической документации на используемые приборы.

3.2 Работу с химическими реактивами проводят в вытяжном шкафу.

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений».

*** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

*[4] В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 6497—2011 «Корма для животных. Отбор проб».

3.3 Помещение должно быть оснащено вентиляционными системами по ГОСТ 12.4.021, соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

3.4 Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

4 Условия проведения испытаний

При подготовке и проведении испытаний должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды . . . . . от 15 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . не более 80 %;
- атмосферное давление . . . . . (97 ± 10) кПа.

5 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное образование и опыт работы в химической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж, освоившего методы в процессе обучения и уложившегося в нормативы оперативного контроля при выполнении процедур контроля точности испытаний.

6 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 17681, ГОСТ 27668, ГОСТ 28178, ГОСТ 27262.

7 Подготовка проб

Подготовка проб — по ГОСТ ISO 6498.

8 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на аминокислотном анализаторе

8.1 Сущность метода

8.1.1 Сущность метода заключается в разложении пробы кислотным гидролизом для определения лизина или щелочным гидролизом для определения триптофана с переводом аминокислот в свободные формы, их разделении колоночной ионообменной хроматографией с постколоночной дериватизацией нингидрином.

8.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

Весы неавтоматического действия по ГОСТ R OIML 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности ±0,001 г и специального класса точности с пределами допускаемой погрешности не более ±0,0005 г.

Шкаф сушильный электрический вентилируемый, обеспечивающий поддержание температуры (110 ± 2) °С.

Анализатор аминокислотный с ионообменной колонкой, устройством для послеколоночной дериватизации нингидрином, детектором и набором реактивов.

Устройство для выпаривания.

Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

pH-метр с пределом допускаемой погрешности ± 0,1 ед. pH.

Виалы с завинчивающимися термостойкими крышками и фторопластовыми вкладышами вместимостью 15—25 см^3 (далее — виалы для гидролиза).

Колбы мерные 1(2)-50(100, 1000)-2 по ГОСТ 1770.

Пробирки П-1(2)-20-0,2 ХС по ГОСТ 1770.

Цилиндры мерные 1(2, 2а, 3, 4)-50(100, 250)-2 по ГОСТ 1770.

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

Емкости с завинчивающимися крышками вместимостью 25 см^3.

Пипетки градуированные 1(2)-1(1а, 2, 2а)-1(2)-1(2, 5, 10) по ГОСТ 29227.
Воронки лабораторные В-36(56)-80 ХС по ГОСТ 25336.
Ступка фарфоровая.
Стакан фарфоровый 4 вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 9147.
Фильтры обеззоленные «синяя лента».
Фильтр мембранный.
Триптофан с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.
L-лизин моногидрохлорид с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.
Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.
Спирт этиловый по ГОСТ 5962, первого сорта.
Бария гидроокись 8-водная по ГОСТ 4107, х. ч.
Натрий углекислый безводный по ГОСТ 83, х. ч.
Натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280, ч. д. а.
Фенол по ГОСТ 23519.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.
Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, абсолютированный.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками не хуже указанных.

2 Допускается использование реактивов аналогичной или более высокой квалификации, по качеству не хуже указанных.

8.3 Приготовление растворов

8.3.1 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации *c* (HCl) = 6 моль/дм^3

Раствор готовят смешиванием соляной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 1:1 по объему.

Срок хранения раствора не ограничен.

8.3.2 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации *c* (HCl) = 0,1 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 пипеткой вносят 8,3 см^3 концентрированной соляной кислоты и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой (см. 6.3.1).

Примечание — Допускается готовить раствор из стандарт-титра соляной кислоты молярной концентрации *c* (HCl) = 0,1 моль/дм^3.

8.3.3 Приготовление раствора гидроокиси натрия с массовой долей 50 %

В фарфоровом стакане растворяют небольшими порциями 80,0 г гидроокиси натрия в 120 см^3 дистиллированной воды при перемешивании. После охлаждения раствор переливают в полиэтиленовую емкость.

Срок хранения раствора не ограничен.

8.3.4 Приготовление буферного раствора с 2,2 ед. pH

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 19,6 г лимоннокислого натрия, растворяют в 200—300 см^3 дистиллированной воды, приливают 16,6 см^3 концентрированной соляной кислоты, 1 см^3 фенола и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Концентрацию водородных ионов контролируют на pH-метре и при необходимости корректируют раствором гидроокиси натрия (см. 8.3.3) или концентрированной соляной кислотой.

Срок хранения раствора — не более 2 мес.

8.3.5 Приготовление нейтрализующего раствора

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 г гидроокиси натрия, растворяют в буферном растворе (см. 8.3.4), охлаждают и доводят объем до метки тем же буферным раствором.

Срок хранения раствора в плотно закрытой полиэтиленовой посуде — не более 2 мес.

8.3.6 Приготовление раствора изопропилового спирта

Раствор готовят смешиванием изопропилового спирта и дистиллированной воды в соотношении 1:9 по объему.

Срок хранения раствора не ограничен.

8.3.7 Приготовление раствора углекислого натрия с массовой долей 10 %

Натрий углекислый массой 10,0 г растворяют в 90 см^3 дистиллированной воды.

Срок хранения раствора не ограничен.

8.3.8 Приготовление основного раствора лизина массовой концентрации 2,5 мг/см^3

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают (156,0 ± 0,5) мг L-лизина моногидрохлорида, добавляют раствор соляной кислоты (см. 8.3.2), после полного растворения доводят объем до метки тем же раствором соляной кислоты.

Срок хранения раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 4 мес.

8.3.9 Приготовление основного раствора триптофана массовой концентрации 2,5 мг/см^3

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают (125,0 ± 0,5) мг триптофана, добавляют раствор изопропилового спирта (см. 8.3.6), после полного растворения доводят объем до метки тем же раствором изопропилового спирта.

Срок хранения раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 4 мес.

8.3.10 Приготовление растворов сравнения лизина и триптофана

Для каждой определяемой аминокислоты готовят раствор сравнения с массовой концентрацией, зависящей от предполагаемой массовой доли лизина или триптофана в анализируемой пробе. Растворы сравнения аминокислот готовят из их основных растворов (см. 8.3.8, 8.3.9) разведением буферным раствором (см. 8.3.4) для лизина и раствором изопропилового спирта (см. 8.3.6) для триптофана.

Растворы готовят в день проведения испытаний.

8.4 Подготовка аминокислотного анализатора

Аминокислотный анализатор готовят к работе в соответствии с инструкцией (руководством) к прибору.

8.5 Проведение испытания

8.5.1 Проведение кислотного гидролиза анализируемой пробы для определения массовой доли лизина

8.5.1.1 Навеску пробы массой (100,0 ± 0,5) мг аккуратно помещают на дно виалы для гидролиза, добавляют две-три капли этилового спирта и добавляют 10 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации 6 моль/дм^3 (см. 8.3.1). Виалу для гидролиза герметично закрывают завинчивающейся крышкой и помещают в предварительно нагретый до температуры 110 °С сушильный шкаф на 24 ч. После завершения гидролиза виалу охлаждают до комнатной температуры, взбалтывают и фильтруют содержимое через фильтр «синяя лента», отбросив первые порции.

Примечание — Для уменьшения времени гидролиза допускается проводить гидролиз в автоклаве при давлении 0,25 МПа и температуре 137 °С в течение 3 ч.

8.5.1.2 2 см^3 фильтрата выпаривают досуха на устройстве для выпаривания, остаток растворяют в 10 см^3 буферного раствора (см. 8.3.3) или добавляют 5 см^3 нейтрализующего раствора (см. 8.3.4) и перемешивают.

Примечание — При отсутствии устройства для выпаривания допускается проводить выпаривание фильтрата на водяной бане.

8.5.2 Проведение щелочного гидролиза анализируемой пробы для определения массовой доли триптофана

8.5.2.1 Навеску пробы массой (200,0 ±0,5) мг аккуратно помещают на дно виалы для гидролиза, добавляют две-три капли этилового спирта, 1,6 г свежерастертой в фарфоровой ступке гидроокиси бария и содержимое тщательно перемешивают. Затем приливают 3 см^3 дистиллированной воды. Виалу для гидролиза герметично закрывают завинчивающейся крышкой и помещают в предварительно нагретый до температуры 110 °С сушильный шкаф на 18 ч. По окончании гидролиза виалу тщательно встряхивают, охлаждают до комнатной температуры и помещают в холодильник на 1,5—2 ч для осаждения ионов бария.

8.5.2.2 Методом обратного фильтрования отбирают 1 см^3 надосадочной жидкости и добавляют 1 см^3 раствора углекислого натрия (см. 8.3.7) для осаждения оставшегося бария. Пробирку с полученным раствором закрывают пробкой и хранят в холодильнике.

Перед проведением хроматографии температуру гидролизата доводят до комнатной.

8.5.2.3 Перед нанесением на хроматографическую колонку аликвотную часть гидролизата подкисляют концентрированной соляной кислотой до 2,2 ед. pH и приливают объем буферного раствора

(см. 8.3.4), равный аликвотной части гидролизата. При расчете массовой доли аминокислоты в пробе учитывают коэффициент разбавления Q, который вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_к}{V_а}, \quad (1)$$

где $V_к$ — объем полученного разбавленного раствора, см^3;

$V_а$ — объем аликвоты гидролизата, см^3.

8.5.3 Проведение хроматографирования

8.5.3.1 Гидролизат (см. 8.5.1 или 8.5.2) перемешивают и необходимое количество фильтруют через мембранный фильтр. Полученный раствор наносят на колонку аминокислотного анализатора.

Вводимые объемы гидролизата анализируемой пробы и раствора сравнения лизина или треонина должны быть одинаковыми.

Градуировку, контроль стабильности градуировочной характеристики и анализ проводят в соответствии с инструкцией к аминокислотному анализатору.

8.5.3.2 При наличии программного обеспечения к аминокислотному анализатору массовая концентрация аминокислоты в гидролизате рассчитывается автоматически ($С_{изм}$). Массовую долю аминокислоты в анализируемой пробе вычисляют по формуле (3).

8.5.3.3 При отсутствии программного обеспечения к анализатору для расчета массовой доли аминокислоты в анализируемой пробе вычисляют площади хроматографических пиков, которые пропорциональны концентрациям аминокислот, анализируемой пробы и растворов сравнения для лизина или треонина.

Для расчета площади пика на хроматограмме проводят базовую линию, касательную к двум основаниям, и высоту h, проходящую через вершину кривой параллельно оси ординат. На уровне, равном половине высоты, проводят линию, параллельную базовой. Отрезок, отсекаемый на этой линии кривой, называется полушириной пика b (см. рисунок 1).

Площадь пика S_r, мм^2, вычисляют по формуле

$$S_r = h \cdot b, \quad (2)$$

где h — высота, проходящая через вершину кривой параллельно оси ординат, мм;

b — полуширина пика, мм.

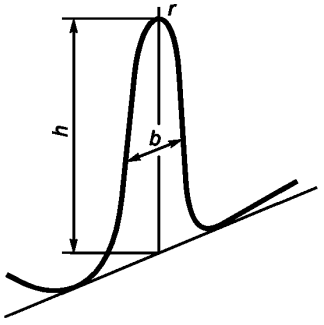


Рисунок 1 — Пик на хроматограмме

8.6 Обработка результатов

8.6.1 Учитывая полученную по 8.5.3.2 массовую концентрацию аминокислоты, массовую долю аминокислоты в пробе X, %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{V \cdot С_{изм} \cdot 100}{m \cdot 1000} \cdot Q, \quad (3)$$

где V — конечный объем гидролизата, см^3;

$С_{изм}$ — полученное значение массовой концентрации аминокислоты в гидролизате, мг/дм^3;

100 — коэффициент пересчета в проценты;

m — масса навески пробы, мг;

1000 — коэффициент согласования размерности единиц измерения объема;

Q — коэффициент разбавления.

8.6.2 Без использования программного обеспечения к аминокислотному анализатору массовую долю аминокислоты X, %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \cdot S_r \cdot V \cdot 100}{S_{ст} \cdot m} \cdot Q, \quad (4)$$

где C — массовая концентрация раствора сравнения аминокислоты (см. 8.3.8), мг/см^3;

S_r — площадь пика аминокислоты гидролизата, мм^2;

V — конечный объем гидролизата, см^3;

100 — коэффициент пересчета в проценты;

$S_{ст}$ — площадь пика аминокислоты раствора сравнения, мм^2;

m — масса навески пробы, взятая на гидролиз, мг;

Q — коэффициент разбавления.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака с последующим округлением до второго десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных испытаний, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.2.

9 Метод тонкослойной хроматографии в фиксированном слое ионообменника

9.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в разложении пробы кислотным гидролизом для определения лизина или щелочным гидролизом для определения триптофана с переводом аминокислот в свободные формы, избирательной сорбции аминокислот в тонком слое ионообменника, обработке хроматографических пластин кадмиево-нингидриновым реактивом и денситометрировании хроматограмм.

9.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

Денситометр или экстинкционно-регистрирующий прибор с интегратором для анализа, обеспечивающий измерение при длине волны 530 нм.

Вентилятор бытовой.

Пульверизатор стеклянный.

Шкаф сушильный электрический вентилируемый, обеспечивающий поддержание температуры (110 ± 2) °С.

Термостат воздушный с регулируемой температурой от 20 °С до 70 °С.

pH-метр с пределом допускаемой погрешности 0,1 ед. pH.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ R OIML 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности ± 0,001 г и специального класса точности с пределами допускаемой погрешности не более ±0,0005 г.

Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

Микрошприц вместимостью 0,01 см^3.

Пластинки хроматографические размером 20 × 20 см.

Полоски из органического стекла.

Пробирки мерные П-2-10-0,1 ХС по ГОСТ 1770.

Воронки стеклянные В-56(100) ХС по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные 1(2)-1(1а, 2, 2а)-1-1(2, 5, 10) по ГОСТ 29227.

Колбы мерные 2-50(100, 1000)-1 по ГОСТ 1770.

Цилиндры мерные 1(2, 2а, 3, 4)-50(100, 250)-2 по ГОСТ 1770.

Стакан фарфоровый 4 вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 9147.

Фильтры обеззоленные «синяя лента».

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Триптофан с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

L-лизин моногидрохлорид с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч. д. а.

Нингидрин с содержанием основного вещества не менее 99 %.

Фенол по ГОСТ 23519, ч. д. а.

Натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280, х. ч. или ч. д. а.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962.

Кадмий уксуснокислый двухводный с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

Бария гидроокись 8-водную по ГОСТ 4107, х. ч.

Натрий углекислый безводный по ГОСТ 83, х. ч.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Кислота лимонная по ГОСТ 3652, х. ч.

Кислота уксусная по ГОСТ 61, х. ч. ледяная.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, абсолютированный.

Метилцеллозольв (монометиловый эфир этиленгликоля) с массовой долей основного вещества не менее 99,5 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Баня водяная.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками не хуже указанных.

2 Допускается использование реактивов аналогичной или более высокой квалификации, по качеству не хуже указанных.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации c (HCl) = 6 моль/дм^3

Раствор соляной кислоты молярной концентрации c(HCl) = 6 моль/дм^3 готовят по 8.3.1.

9.3.2 Приготовление раствора натрия гидроокиси с массовой долей 50 %

Раствор натрия гидроокиси с массовой долей 50 % готовят по 8.3.3.

9.3.3 Приготовление буферных растворов

Для приготовления буферных растворов используют реактивы, указанные в таблице 1 Корректируют pH буферных растворов соляной кислотой или раствором гидроокиси натрия (см. 9.3.2).

Таблица 1

Реактив	Единица измерения	Масса (объем) реактива для приготовления буферных растворов			
		2,2 ед. pH	3,28 ед. pH	3,3 ед. pH	6,0 ед. pH
Лимонная кислота	г	—	1,4	84,0	7,0
Натрий лимоннокислый	г	19,6	—	—	—
Натрия гидроокись	г	—	0,8	16,0	4,0
Натрий хлористый	г	—	—	—	81,9
Соляная кислота	см^3	16,6	1,2	5,9	—
Метилцеллозольв	см^3	—	—	—	100,0
Фенол	см^3	1,0	1,0	1,0	1,0

Буферные растворы готовят в мерной колбе вместимостью 1000 см^3, растворы доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения растворов — не более 2 мес. При наличии в растворе помутнения и хлопьевидного осадка раствор следует заменить свежеприготовленным.

9.3.4 Приготовление раствора нингидрина

Нингидрин кристаллический массой 0,5 г растворяют в 50 см^3 ацетона.

Раствор готовят непосредственно перед испытанием.

9.3.5 Приготовление раствора уксуснокислого кадмия

Уксуснокислый кадмий массой 1,0 г растворяют в 50 см^3 ледяной уксусной кислоты и добавляют 100 см^3 дистиллированной воды.

Срок хранения раствора не ограничен.

9.3.6 Приготовление кадмиево-нингидринового реактива

Смешивают 50 см^3 раствора нингидрина (см. 9.3.4) и 10 см^3 раствора уксуснокислого кадмия (см. 9.3.5).

Раствор готовят непосредственно перед испытанием.

9.3.7 Приготовление раствора углекислого натрия с массовой долей 10 %

Раствор углекислого натрия с массовой долей 10 % готовят по 8.3.7.

9.3.8 Приготовление раствора изопропилового спирта

Раствор изопропилового спирта готовят по 9.3.9.

9.3.9 Приготовление основных растворов лизина и триптофана

Основные растворы лизина готовят по 8.3.6, триптофана — по 8.3.7.

9.3.10 Приготовление градуировочных растворов лизина и триптофана

Для каждой определяемой аминокислоты готовят по три градуировочных раствора с массовыми концентрациями, зависящими от массовых долей лизина и триптофана анализируемых проб. Градуировочные растворы аминокислот готовят из основных растворов разведением буферным раствором с 2,2 ед. pH (см. 9.3.3) для лизина и раствором изопропилового спирта (см. 9.3.8) для триптофана.

Растворы готовят в день проведения испытаний.

9.4 Подготовка к хроматографированию

9.4.1 Уравновешивание хроматографической пластинки

Хроматографическую пластинку обратной стороной накладывают на стеклянную пластинку, накрывают двумя слоями фильтровальной бумаги размером 20 × 30 см. Перегнув выступающий конец фильтровальной бумаги через верхний край стеклянной пластинки, закрепляют его резиновым кольцом.

Стопку пластинок от 3 до 5 шт. помещают в камеру для хроматографирования, в которую предварительно наливают буферный раствор с 3,28 ед. pH (см. 9.3.3) слоем 1,0—1,5 см. Нижний край пластинок должен быть погружен в раствор на 1,0 см. Пластинки выдерживают в закрытой камере в течение суток при комнатной температуре, затем удаляют фильтровальную бумагу и высушивают на воздухе.

Пластинки хранят в темном месте не более 1 мес.

9.4.2 Подготовка пластинок к хроматографированию

С краев уравновешенных пластинок счищают ионообменный слой смолы шириной 3 мм для более равномерного продвижения буферного раствора. На расстоянии 2 см от нижнего края пластинки простым карандашом проводят две линии с расстоянием между ними не более 1 мм (линия старта). На линии старта размечают 12 полосок длиной 1,0 см с расстоянием между ними 0,5 см. Каждую полоску ограничивают вертикальными бороздками (бороздки проводят острым предметом) для предотвращения расплывания пятен в ширину при хроматографировании.

9.4.3 Подготовка камеры для хроматографии

Хроматографическую камеру предварительно насыщают буферным раствором с 3,3 ед. pH (см. 8.3.3) — для определения лизина, с 6,0 ед. pH — для определения триптофана.

Для этого стенки камеры выстилают одним слоем фильтровальной бумаги и на дно наливают используемый буферный раствор слоем 1,5 см. Герметично закрытую камеру помещают в термостат, предварительно прогретый до температуры 60 °С для лизина и до температуры 30 °С для триптофана, на 15—20 мин до полного пропитывания бумаги.

9.4.4 Подготовка микрошприца

Из микрошприца удаляют шток, на верхний конец стеклянного цилиндра надевают резиновую трубку длиной 30 мм. Конец иглы микрошприца обрезают перпендикулярно ее длине на уровне половины скоса и срез зашлифовывают во избежание повреждения слоя смолы при нанесении растворов.

9.5 Проведение испытания

9.5.1 Проведение кислотного гидролиза анализируемой пробы для определения массовой доли лизина

9.5.1.1 Кислотный гидролиз анализируемой пробы проводят по 8.5.1.1.

9.5.1.2 2 см^3 фильтрата выпаривают досуха на устройстве для выпаривания, осадок растворяют в 5 см^3 буферного раствора с 2,2 ед. pH (см. 9.3.3).

Примечание — При отсутствии устройства для выпаривания допускается проводить выпаривание фильтрата на водяной бане.

9.5.2 Проведение щелочного гидролиза анализируемой пробы для определения массовой доли триптофана

Щелочной гидролиз анализируемой пробы проводят по 8.5.2.1 и 8.5.2.2.

9.5.3 Нанесение растворов на пластинки

Гидролизаты (см. 9.5.1 или 9.5.2) и градуировочные растворы лизина и триптофана (см. 9.3.10) наносят на полоски хроматографической пластинки микрошприцом в токе теплого воздуха. Нанесенный на полоску раствор высушивают. Операцию нанесения и высушивания раствора повторяют до тех пор, пока не будет нанесена вся микродоза.

Для проб с массовой долей лизина до 1,0 % и триптофана — до 0,2 % наносят 0,010 $см^3$ гидролизата, для проб с большим содержанием аминокислот — 0,005 $см^3$. На каждую пластину наносят такие же объемы трех градуировочных растворов аминокислот с массовыми концентрациями, близкими к концентрациям определяемых аминокислот в гидролизатах.

9.5.4 Хроматографирование

9.5.4.1 Проведение хроматографии для лизина

Пластинку с нанесенным гидролизатом накладывают обратной стороной на стекло такого же размера. К верхнему краю пластинки прикрепляют фильтровальную бумагу размером 20 × 15 см так, чтобы она закрывала верхний край ионообменного слоя шириной 1 см, а свободный загибают на противоположную сторону стекла. На край бумаги, закрывающий ионообменный слой, накладывают полоску органического стекла и закрепляют резиновым кольцом. Затем пластинку помещают в предварительно нагретую до температуры 60 °С хроматографическую камеру так, чтобы нижний край был погружен в буферный раствор с 3,3 ед. pH (см. 9.3.3) на 1 см. Камеру герметично закрывают и помещают в термостат. Хроматографирование проводят при температуре 60 °С в течение 5 ч.

9.5.4.2 Проведение хроматографии для триптофана

Пластинку с нанесенным гидролизатом накладывают обратной стороной на стекло такого же размера и помещают в предварительно нагретую до температуры 30 °С хроматографическую камеру так, чтобы нижний край был погружен в буферный раствор с 6,0 ед. pH (см. 9.3.3) на 1 см. Камеру герметично закрывают и помещают в термостат. Хроматографирование проводят при температуре 30 °С в течение 3 ч.

9.5.5 Проявление хроматограммы

По окончании хроматографирования пластинки вынимают из камеры и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу. По всей поверхности пластинки распыляют пульверизатором кадмиево-нингидриновый реактив (см. 9.3.6) до полного смачивания. Реактив наносят равномерно, не допуская подтеков. После опрыскивания пластинку высушивают на воздухе в вытяжном шкафу и помещают на ночь в термостат при температуре 30 °С для полного развития окраски зон аминокислот.

9.5.6 Денситометрирование

Пластинку разрезают на отдельные хроматограммы и денситометрируют при длине волны 530 нм. В результате получают денситограмму с пиками, площади которых пропорциональны концентрациям аминокислот.

Площадь пика определяют по 8.5.3.3.

9.5.7 Построение градуировочного графика

Градуировочный график строят для каждой хроматографической пластинки. На оси абсцисс откладывают концентрации трех градуировочных растворов а по оси ординат — соответствующие им площади пиков.

По построенному градуировочному графику определяют массовую концентрацию аминокислоты в гидролизате анализируемой пробы.

9.6 Обработка результатов

Массовую долю аминокислоты X, %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_1 \cdot V \cdot 100}{m}, \quad (5)$$

где C_1 — массовая концентрация аминокислоты в гидролизате пробы, найденная по градуировочному графику, мг/$см^3$;

V — конечный объем гидролизата, $см^3$;

100 — коэффициент пересчета в проценты;

m — масса навески, взятая для гидролиза, мг.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака с последующим округлением до второго десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных испытаний, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.2.

10 Колориметрический метод определения содержания триптофана с *n*-парадиметиламинобензальдегидом

10.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в разложении пробы щелочным гидролизом с переводом триптофана в свободную форму, окрашивании гидролизата *n*-парадиметиламинобензальдегидом в кислой среде и измерении его оптической плотности.

10.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

Шкаф сушильный электрический вентилируемый, обеспечивающий поддержание температуры (110 ± 2) °С.

Термостат воздушный с регулируемой температурой от 20 °С до 70 °С.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ R OIML 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности ± 0,001 г и специального класса точности с пределами допускаемой погрешности не более ± 0,0005 г.

Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

Фотоэлектроколориметр со спектральным диапазоном, позволяющий проводить измерения при длине волны 650 нм (красный светофильтр), с кюветой с толщиной поглощающего свет слоя 5 мм.

Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 3000 об/мин.

Насос вакуумный.

Баня ледяная.

Баня водяная.

Колбы мерные 1(2)-50(100, 1000)-2 по ГОСТ 1770.

Пипетки градуированные 1(2)-1(1а, 2, 2а)-1(2)-1 (2, 5, 10) по ГОСТ 29227.

Пробирки тефлоновые с завинчивающимися крышками вместимостью 50 см^3.

Емкости из темного стекла с притертыми крышками вместимостью 100 и 1000 см^3.

Колба с тубусом 1(2)-250 (500) по ГОСТ 25336.

Воронка Бюхнера 3(4) по ГОСТ 9147.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Казеин по Гаммерстену.

Триптофан с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

Спирт этиловый по ГОСТ 5962, первого сорта.

Бария гидроокись по ГОСТ 4107, ч.

n-диметиламинобензальдегид с содержанием основного вещества не менее 98,0 %.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Нитрит натрия по ГОСТ 4197, х. ч.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Примечания

1 Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками не хуже указанных.

2 Допускается использование реактивов аналогичной или более высокой квалификации, по качеству не хуже указанных.

10.3 Приготовление растворов

10.3.1 Приготовление раствора нитрита натрия с массовой долей 0,2 %

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 растворяют 0,20 г нитрита натрия в дистиллированной воде, объем раствора доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор готовят в день проведения испытания.

10.3.2 Приготовление раствора *n*-диметиламинобензальдегида с массовой долей 0,5 %

10.3.2.1 Перекристаллизация *n*-диметиламинобензальдегида

Растворяют 70,0 г *n*-диметиламинобензальдегида в 100 см^3 теплого 96 %-ного этилового спирта, охлаждают в ледяной бане. Выпавшие в осадок кристаллы отфильтровывают на воронке Бюхнера и высушивают при комнатной температуре между листами фильтровальной бумаги.

Высушенные кристаллы хранят в емкости из темного стекла с притертой крышкой до изменения внешних характеристик.

10.3.2.2 В мерной колбе вместимостью 1000 см^3 растворяют 5,0 г перекристаллизованного *n*-диметиламинобензальдегида в концентрированной соляной кислоте и доводят объем раствора до метки той же кислотой.

Срок хранения раствора в емкости из темного стекла с притертой крышкой — 1 мес.

10.3.3 Раствор соляной кислоты молярной концентрации $c(HCl) = 6$ моль/дм^3 готовят по 8.3.1.

10.3.4 Приготовление основного раствора триптофана массовой концентрации 1 мг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят (100,0 ± 0,5) мг триптофана, добавляют 50—70 см^3 дистиллированной воды и перемешивают. При необходимости нагревают на водяной бане с температурой не более 80 °С, после полного растворения и охлаждения доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 2 мес.

10.3.5 Приготовление градуировочных растворов

В девять мерных колб вместимостью 50 см^3 последовательно вносят основной раствор триптофана (см. 10.3.4) в объемах, указанных в таблице 2. Объемы растворов доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Таблица 2

Наименование показателя	Номер градуировочного раствора								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Объем основного раствора триптофана, см^3	0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5
Массовая концентрация триптофана в градуировочных растворах в пересчете на массовую долю триптофана в анализируемой пробе, г/кг	0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5

Срок хранения градуировочных растворов в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 2 нед.

10.4 Построение градуировочного графика

Пипеткой отбирают по 2 см^3 каждого градуировочного раствора и переносят в центрифужные пробирки. Затем в каждую пробирку добавляют по 5 см^3 раствора *n*-диметиламинобензальдегида (см. 10.3.2), перемешивают. Через 25 мин приливают по 0,2 см^3 раствора нитрита натрия (см. 10.3.1), перемешивают и центрифугируют в течение 3 мин с частотой вращения 3000 об/мин. Через 10 мин растворы фотометрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром при длине волны 650 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 5 мм относительно первого градуировочного раствора.

Строят градуировочный график, откладывая по оси абсцисс массовую концентрацию триптофана в градуировочных растворах в пересчете на массовую долю триптофана в анализируемой пробе, в граммах на 1 кг, а по оси ординат — соответствующую величину оптической плотности.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднеарифметическое значение оптической плотности результатов двух измерений каждого градуировочного раствора.

Градуировочный график проверяют по трем градуировочным растворам в том интервале, в котором проводят испытания.

Градуировку признают стабильной, если отклонение найденной массовой доли триптофана от заданного значения не превышает 5 %. В противном случае анализируют градуировочный раствор еще два раза. При повторных отклонениях, превышающих указанный норматив хотя бы один раз, градуировку проводят заново, начиная с приготовления нового основного раствора (см. 10.3.3).

10.5 Проведение испытания

Навеску массой (100,0 ± 0,5) мг аккуратно переносят на дно тефлоновой пробирки, добавляют 0,8 г свежерастертой гидроокиси бария и содержимое тщательно перемешивают. Затем приливают 1,5 см^3 дистиллированной воды. Пробирку герметично закрывают завинчивающейся крышкой и аккуратно встряхивают для равномерного смачивания и перемешивания содержимого. Пробирку устанавливают вертикально в штатив и помещают в предварительно нагретый до температуры 110 °С сушильный шкаф на 18 ч.

По окончании гидролиза пробирку с раствором тщательно встряхивают, охлаждают до комнатной температуры и помещают в морозильную камеру холодильника на 20—30 мин. Охлажденный гидролизат быстро нейтрализуют, приливая в пробирку 0,8 см^3 раствора соляной кислоты (см. 10.3.5), которую также предварительно охлаждают в морозильной камере. Доводят объем раствора дистиллированной водой до 50 см^3. Пробирку завинчивают крышкой, раствор перемешивают и центрифугируют в течение 5 мин с частотой вращения 3000 об/мин. Пипеткой осторожно над осадком отбирают 2,0 см^3 гидролизата, переносят в центрифужную пробирку, добавляют 5,0 см^3 раствора *n*-диметиламинобензальдегида (см. 9.3.2) и перемешивают. Через 25 мин в пробирку приливают 0,2 см^3 раствора нитрита натрия (см. 10.3.1), перемешивают и центрифугируют в течение 3 мин с частотой вращения 3000 об/мин.

Через 10 мин раствор фотометрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром при длине волны 650 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 5 мм относительно первого градуировочного раствора.

Примечание — Для проб с высокой массовой долей триптофана допускается разведение гидролизатов первым градуировочным раствором, приготовленным по 10.3.4, с дальнейшим его учетом в формуле (5).

Для определения потерь триптофана и установления коэффициента его разрушения параллельно проводят гидролиз абсолютно сухого казеина массой (0,050 ± 0,001) г в трехкратной повторности, где для окрашивания вместо 2 см^3 гидролизата анализируемой пробы берут 1 см^3 гидролизата казеина.

Коэффициент разрушения триптофана K при гидролизе вычисляют по формуле

$$K = \frac{17,0}{4 \cdot C_2}, \quad (6)$$

где 17,0 — теоретическая массовая доля триптофана в казеине по Гаммерстену, г/кг;

4 — коэффициент.

C_2 — среднеарифметическое значение массовой доли триптофана в пробах казеина, найденное по градуировочному графику, г/кг.

10.6 Обработка результатов

Массовую долю триптофана *X*, %, вычисляют по формуле

$$\frac{K \cdot C_3 \cdot 100}{1000}, \quad (7)$$

где K — коэффициент разрушения триптофана по формуле (6);

C_3 — массовая концентрация триптофана в пробе, найденная по градуировочному графику с учетом разведения, г/кг;

100 — коэффициент перевода результата в проценты;

1000 — коэффициент согласования единиц массы.

Вычисления проводят до третьего десятичного знака с последующим округлением до второго десятичного знака.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных испытаний, выполненных в условиях повторяемости и удовлетворяющих условию приемлемости 11.2.

11 Контроль точности результатов испытаний

11.1 Контроль точности результатов испытаний должен соответствовать ГОСТ ИСО 5725-1, ГОСТ ИСО 5725-2 и ГОСТ ИСО 5725-6.

11.2 Приемлемость результатов испытаний, полученных в условиях повторяемости (сходимости)

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом, на одной лабораторной пробе, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, на одном и том же экземпляре оборудования в течение короткого промежутка времени при доверительной вероятности $P = 0,95$, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) *r*, относительная величина которого приведена в таблице 3.

Таблица 3 — Метрологические характеристики метода определения массовой доли лизина и триптофана при доверительной вероятности P = 0,95 %

В процентах

Наименование аминокислоты (метод определения)	Диапазон измерений	Предел повторяемости r	Предел воспроизводимости R	Границы относительной погрешности $\pm \delta$
Лизин (метод ВЭЖХ на аминокислотном анализаторе)	От 0,15 до 10,0 включ.	10	25	15
Триптофан (метод ВЭЖХ на аминокислотном анализаторе)	От 0,1 до 2,0 включ.	10	25	15
Лизин (метод тонкослойной хроматографии)	От 0,25 до 10,0 включ.	20	30	18
Триптофан (метод тонкослойной хроматографии)	От 0,1 до 2,0 включ.	20	30	18
Триптофан (колориметрический метод)	От 0,15 до 2,0 включ.	10	20	8

Если расхождение между результатами параллельных испытаний превышает предел повторяемости, то испытание повторяют, начиная со взятия навески.

Если расхождение между результатами параллельных испытаний вновь превышает предел повторяемости, выясняют и устраняют причины плохой повторяемости результатов испытаний.

11.3 Приемлемость результатов испытаний, полученных в условиях воспроизводимости

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичных пробах в разных лабораториях разными операторами на различных экземплярах оборудования при доверительной вероятности P = 0,95 %, не должно превышать предела воспроизводимости R, относительная величина которого приведена в таблице 3.

При выполнении этого условия приемлемы оба результата испытаний, и в качестве окончательного может быть использовано их среднеарифметическое значение. Если это условие не соблюдается, могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно ГОСТ ИСО 5725-6.

12 Оформление результатов испытаний

Результат определения массовой доли аминокислоты в пробе, вычисленный по формулам (3)—(5), (7), представляют в виде ($X \pm \Delta$), %, где Δ — граница абсолютной погрешности измерений при доверительной вероятности P = 0,95 %, которую вычисляют по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot X \cdot \delta, \qquad (8)$$

где 0,01 — коэффициент;

X — результат определения массовой доли аминокислоты по формулам (3)—(5), (7), %;

δ — граница относительной погрешности измерений при доверительной вероятности P = 0,95, %, значение которой приведено в таблице 3.

13 Оформление протокола испытаний

Результаты оформляют в виде протокола испытаний, который должен включать следующее:

- информацию, необходимую для полной идентификации пробы;
- использованный метод отбора проб;
- использованный метод анализа, со ссылкой на настоящий стандарт;
- обстоятельства, которые могли повлиять на результат испытания;
- полученный результат испытания.

УДК 636.085.3:006.354 МКС 65.120

Ключевые слова: корма, комбикорма, комбикормовое сырье, аминокислоты, лизин, триптофан, кислотный и щелочной гидролиз, дериватизация, нингидрин, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, колориметрический метод

Редактор *Н.Н. Мигунова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 15.03.2016. Подписано в печать 22.03.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,75. Тираж 44 экз. Зак. 817.

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

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

gost.e-ecolog.ru