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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32201— 2013 (ISO 13904:2005)

КОРМА, КОМБИКОРМА

Метод определения содержания триптофана

(ISO 13904:2005, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

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

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 14 ноября 2013 г. № 44)

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
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному стандарту ISO 13904:2005 Animal feeding stuffs — Determination of tryptophan content (Корма для животных. Определение содержания триптофана).

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

Перевод с английского языка (en).

Уточняющие отдельные слова, фразы, абзацы внесены в текст межгосударственного стандарта для приведения в соответствие с требованиями ГОСТ 1.5—2001, отраслевой терминологией и выделены курсивом. Дополнительные примечания, разделы, таблица и приложения выделены полужирным курсивом.

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

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта в соответствии с требованиями межгосударственной системы стандартизации и общепринятой отраслевой терминологией.

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеются в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии.

Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта приведено в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — модифицированная (MOD)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 1698-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32201—2013 (ISO 13904:2005) введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

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

© Стандартинформ, 2014

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

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 *Нормативные ссылки* . . . 1
3 *Сущность метода* . . . 2
4 *Лабораторное оборудование и посуда* . . . 2
5 Реактивы . . . 2
6 *Приготовление растворов* . . . 3
7 *Отбор проб* . . . 4
8 *Подготовка проб* . . . 4
9 *Проведение испытания* . . . 4
10 *Обработка* результатов . . . 5
11 Прецизионность . . . 5
12 Протокол испытания . . . 6
Приложение А (справочное) Уточнения по выполнению измерений . . . 7
Приложение Б (справочное) Результаты межлабораторных испытаний . . . 8
Приложение ДА (справочное) Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта . . . 10
Библиография . . . 12

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА, КОМБИКОРМА

Метод определения содержания триптофана

Feeds, compound feeds. Method for determination of tryptophan

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт *распространяется* на корма, комбикорма, *а также на* кормовые добавки, концентраты, премиксы, комбикормовое сырье и *устанавливает метод* определения содержания свободного и общего (свободного и связанного) триптофана.

Данный метод не позволяет различить D- и L-*стереоизомеры триптофана.*

2 *Нормативные ссылки*

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4107—78 Реактивы. Бария гидроокись 8-водная. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6552—80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия

ГОСТ 6995—77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 13496.0—80 Комбикорма, сырье. Методы отбора проб*

*ГОСТ 24104—2001** Весы лабораторные. Общие технические требования*

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

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.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 6497—2011.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008.

Издание официальное

3 *Сущность метода*

Для определения общего триптофана анализируемую пробу подвергают щелочному гидролизу в насыщенном растворе гидроксида бария и нагревают до температуры 110 °С в течение 20 ч. После гидролиза добавляют внутренний стандарт.

Для определения свободного триптофана экстракцию проводят в мягких кислых условиях в присутствии внутреннего стандарта.

Триптофан и внутренний стандарт в гидролизате или в экстракте определяют с помощью обратно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентной *детекцией*.

4 *Лабораторное оборудование и посуда*

4.1 *Хроматограф жидкостный* со спектрофлуоресцентным детектором.

4.2 Колонка хроматографическая *размерами* 125 × 4 мм, с наполнителем C_{18} с *размером частиц* 3 мкм или эквивалентным.

4.3 pH-метр.

4.4 Колба полипропиленовая вместимостью 125 *см*^{3} с широким горлышком и завинчивающейся крышкой.

4.5 Фильтр мембранный с *размером пор* 0,45 мкм.

4.6 Автоклав, способный поддерживать температуру (110 ± 2) °С и давление [(140 ± 10) кПа (1,4 ± 0,1) бар].

При использовании герметично закрывающихся емкостей (см. 4.9) допускается применение сушильного шкафа, поддерживающего температуру (110 ± 2) °С.

4.7 Шейкер механический или мешалка магнитная.

4.8 Вортекс-миксер.

4.9 Емкости герметично закрывающиеся, которые могут использоваться при температуре (110 ± 2) °С.

4.10 Колбы мерные 1(2)-50(100, 500, 1000) — 2 по ГОСТ 1770.

4.11 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г и допускаемой погрешностью ± 0,0001 г.

4.12 Пипетки градуированные 1(2, 3, 5)-1(1а, 2, 2а)-1-1(2, 5, 10) по ГОСТ 29227.

4.13 Колбы конические Кн-2-250-ТХС по ГОСТ 25336.

4.14 Стаканы В(Н)-1(2)-50(1000) ТХС по ГОСТ 25336.

4.15 Сито с размером стороны квадратной ячейки 0,5 мм.

Примечание — Допускается применение средств измерений, вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также материалов, по качеству не ниже указанных

5 Реактивы

5.1 Вода, дважды дистиллированная или вода эквивалентной чистоты (электропроводность менее 10 мкс/см).

5.2 Стандартный образец триптофана (с массовой долей основного вещества не менее 99 %), высушенный в вакууме над пятиокисью фосфора.

5.3 Внутренний стандарт: α-метилтриптофан (с массовой долей основного вещества не менее 99 %), высушенный в вакууме над пятиокисью фосфора.

5.4 *Гидроокись* бария *8-водная по ГОСТ 4107, х. ч.*

Примечание — Следует избегать контакта $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ с воздухом, чтобы исключить образование $BaCO_3$, который может мешать определению (см. приложение *А*.3).

5.5 Натрия *гидроокись по ГОСТ 4328.*

5.6 Кислота ортофосфорная с *массовой долей* 85 %.

5.7 Кислота соляная *по ГОСТ 3118,* концентрированная, ρ_{20} = 1,19 г/*см*^{3}.

5.8 Метанол *по ГОСТ 6995, степень чистоты* для ВЭЖХ.

5.9 Эфир петролейный, с *температурой* кипения от 40 °С до 60 °С.

5.10 Кислота уксусная по ГОСТ 61.

5.11 Этаноламин с массовой долей основного вещества более 98 %.

5.12 1,1,1-Трихлор-2-метил-2-пропанол.

Примечание — Допускается использование реактивов аналогичной или более высокой квалификации, *изготовленных по другой нормативной или технической документации, в том числе импортных.*

6 *Приготовление растворов*

6.1 Приготовление раствора натрия гидроокиси *молярной концентрации* 1 моль/*дм*^{3}

В мерную колбу вместимостью 1000 *см*^{3} *(см. 4.10) помещают* 40,0 г *гидроокиси* натрия (*см. 5.5*), растворяют в воде *(см. 5.1)* и доводят *объем раствора в колбе водой* до *метки.*

6.2 *Приготовление раствора* соляной кислоты *молярной концентрации* 6 моль/*дм*^{3}

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 *(см. 4.10) вносят* 492 *см*^{3} соляной кислоты (*см. 5.7*) и доводят *объем раствора в колбе до метки* водой (*см. 5.1*).

6.3 *Приготовление раствора* соляной кислоты *молярной концентрации* 1 моль/*дм*^{3}

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 *(см. 4.10)* вносят 82 *см*^{3} соляной кислоты (*см. 5.7*) и доводят *объем раствора в колбе до метки* водой (*см. 5.1*).

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

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 *(см. 4.10)* вносят 8,2 *см*^{3} соляной кислоты (*см. 5.7*) и доводят *объем раствора до метки в колбе* водой (*см. 5.1*).

6.5 *Приготовление раствора* ортофосфорной кислоты *молярной концентрации* 0,5 моль/*дм*^{3}

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 *(см. 4.10)* помещают 34 *см*^{3} ортофосфорной кислоты (*см. 5.6*) и доводят *объем раствора в колбе до метки* водой (*см. 5.1*).

6.6 *Приготовление* концентрированного раствора триптофана *массовой концентрации 0,5 мг/см*^{3}

В мерную колбу вместимостью 500 *см*^{3} *(см. 4.10) помещают* (0,2500 ± 0,0001) г стандартного образца триптофана (*см. 5.2*), добавляют раствор соляной кислоты *молярной концентрации 0,1 моль/дм*^{3} (*см. 6.4*) и *после растворения* доводят *объем раствора* до метки *в колбе этим же раствором соляной кислоты.*

Раствор хранят при температуре минус 18 °С не более четырех недель.

6.7 *Приготовление* концентрированного раствора внутреннего стандарта *массовой концентрации 0,54 мг/см*^{3}

В мерную колбу вместимостью 500 *см*^{3} *(см. 4.10) помещают* (0,2700 ± 0,0001) г внутреннего стандарта (α-метилтриптофана) (*см. 5.3*), добавляют раствор соляной кислоты *молярной концентрации 0,1 моль*/дм^3 (*см. 6.4*) и *после растворения этим же раствором соляной кислоты* доводят *объем раствора в колбе* до метки.

Раствор хранят при температуре минус 18 °С не более четырех недель.

6.8 *Приготовление градуировочного* раствора стандарта образца триптофана и внутреннего стандарта

2,00 *см*^{3} концентрированного раствора триптофана (*см. 6.6*) и 2,00 *см*^{3} концентрированного раствора внутреннего стандарта (α-метилтриптофан) (*см. 6.7*) разбавляют в смеси воды (*см. 5.1*) с метанолом (*см. 5.8*) примерно в таком же объеме и концентрации метанола (10 %—30 %) как в готовом гидролизате.

Раствор готовят только перед использованием.

Во время подготовки *необходимо* защищать *раствор* от прямых солнечных лучей.

6.9 *Приготовление раствора* 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанол *в метаноле*

В мерную колбу вместимостью 100 *см*^{3} *(см. 4.10) помещают* 1 г 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанол (*см. 5.12*) и доводят объем раствора *в колбе* до метки метанолом (*см. 5.8*).

6.10 *Приготовление* подвижной фазы для ВЭЖХ

В стакан вместимостью 1000 см^3 *(см. 4.14)* наливают 900 *см*^{3} воды (*см. 5.1*), растворяют в ней 3,00 г уксусной кислоты (*см. 5.10*) и добавляют 50 *см*^{3} раствора 1,1,1-трихлор-2-метил-2-пропанола (*см. 6.9*). Доводят значение pH до 5,00 этаноламином (*см. 5.11*), *переливают раствор в мерную колбу вместимостью* 1000 *см*^{3} *(см. 4.10) и доводят объем раствора в колбе до метки* водой.

7 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

8 Подготовка проб

Пробу тщательно перемешивают и измельчают до прохода через сито (*см. 4.15*). *Перед измельчением* пробы с высокой влажностью должны быть высушены при температуре не выше 50 °С или лиофилизированы, а пробы с высоким содержанием жира — обезжирены петролейным эфиром (*см. 5.9*).

9 Проведение испытания

9.1 Определение свободного триптофана (экстракция)

На весах (*см. 4.11*) взвешивают от (*1,000 ± 0,001*) г до (*5,000 ± 0,001*) г *пробы*, подготовленной *в соответствии с разделом 8*, и количественно переносят в коническую колбу (*см. 4.13*).

Добавляют 100 *см*^{3} соляной кислоты (*см. 6.4*) и 5,00 *см*^{3} концентрированного внутреннего стандарта (*см. 6.8*). Встряхивают или перемешивают в течение 60 мин с помощью механического шейкера или магнитной мешалки (*см. 4.7*). *Раствору* дают отстояться, затем переносят пипеткой (*см. 4.12*) 10,0 *см*^{3} надосадочной жидкости в стакан (*см. 4.14*). Добавляют 5 *см*^{3} ортофосфорной кислоты (*см. 5.6*) и доводят значение pH до 3,0 ед. pH раствором гидроксида натрия (*см. 6.1*). Добавляют достаточное количество метанола (*см. 5.8*), чтобы получить концентрацию от 10 % до 30 % метанола в конечном объеме. Переносят в мерную колбу соответствующей вместимости и разбавляют водой (*см. 5.1*) до объема, необходимого для хроматографии [приблизительно тот же объем, как в градуировочном растворе стандарта (*см. 6.8*)].

Перед введением в колонку высокоэффективного жидкостного хроматографа несколько *кубических сантиметров* раствора следует профильтровать через мембранный фильтр (*см. 4.5*). Хроматографию проводят в соответствии с *9.3*.

Стандартные растворы и экстракты необходимо защищать от прямых солнечных лучей. Если полученный экстракт невозможно проанализировать ВЭЖХ в тот же день, его хранят не более трех дней при температуре ниже 5 °С.

9.2 Определение общего триптофана (*гидролиз*)

В полипропиленовую колбу вместимостью 125 см^3 (*см. 4.4*) помещают от (*0,1000 ± 0,0002*) г до (*1,0000 ± 0,0002*) г подготовленной *пробы*. Взятая *анализируемая* проба должна содержать около 0,0100 г азота.

В колбу добавляют 8,4 г гидроокиси бария (*см. 5.4*) и 10 *см*^{3} воды (*см. 5.1*). Перемешивают с помощью миксера (*см. 4.8*) или магнитной мешалки (*см. 4.7*), магнит которой должен быть покрыт тефлоном. Обмывают стенки сосуда 4 *см*^{3} воды (*см. 5.1*), плотно закрывают *крышкой* и помещают в автоклав или сушильный шкаф (*см. 4.6*), прогретый в течение 30—60 мин. Закрывают автоклав или сушильный шкаф и выдерживают пробу при температуре (110 ± 2) °С в течение 20 ч.

Перед открытием автоклава температуру необходимо снизить до 100 °С. Для того чтобы избежать кристаллизации гидроокиси бария, добавляют в теплую смесь 30 *см*^{3} воды (*см. 5.1*) комнатной температуры, встряхивают или осторожно перемешивают. *В полученный раствор* добавляют 2,00 *см*^{3} концентрированного внутреннего стандартного раствора (α-метилтриптофан) (*см. 6.7*). Охлаждают сосуд в воде *или* на ледяной бане в течение 15 мин.

В охлажденный гидролизат добавляют 5 *см*^{3} ортофосфорной кислоты (*см. 5.6*). На охлаждающей бане нейтрализуют раствор с помощью раствора соляной кислоты *молярной концентрации* 6 моль/*дм*^{3} (*см. 6.2*) при перемешивании и доводят *значение* pH до 3,0 *ед. pH* с помощью раствора соляной кислоты *молярной концентрации* 1 моль/*дм*^{3} (*см. 6.3*). Добавляют метанол до получения концентрации от 10 % до 30 % метанола в конечном объеме. Переносят в мерную колбу соответствующей вместимости и разбавляют водой (*см. 5.1*) до объема, необходимого для хроматографии (например, 100 *см*^{3}). *При* добавлении метанола не должен *образовываться* осадок.

Перед введением в колонку высокоэффективного жидкостного хроматографа несколько кубических сантиметров раствора следует профильтровать через мембранный фильтр (см. 4.5).

Стандартные растворы и экстракты необходимо защищать от прямых солнечных лучей. Если полученный экстракт невозможно проанализировать ВЭЖХ в тот же день, его следует хранить не более трех дней при температуре ниже 5 °С.

Хроматографию проводят в соответствии с 9.3.

9.3 Хроматография

Рекомендуемые условия для изократического элюирования *приведены в таблице 1. Допускается* применение других *параметров, приведенных в* приложении А (А.1, А.2), *при условии*, что *получаемые* результаты будут *не хуже.*

Таблица 1

Наименование параметра	*Значение и характеристика параметра*
Хроматографическая колонка	*См. 4.2*
Температура колонки	*Комнатная температура*
Подвижная фаза	*См. 6.10*
Скорость потока	*1 см³/мин*
Общее время работы	*Около 34 мин*
Длина волны	*Возбуждения: 280 нм, эмиссии: 356 нм*
Объем инжекции	*20 мм³*

10 *Обработка* результатов

Содержание триптофана *w*, *%*, вычисляют по *формуле*

$$w = \frac{A_{is,cal} \cdot A_{try,sam} \cdot V_{try} \cdot c_{try} \cdot V_{is,sam} \cdot 100}{A_{is,sam} \cdot A_{try,cal} \cdot V_{is,cal} \cdot m}, \quad (1)$$

где $A_{is,cal}$ — площадь пика внутреннего стандарта в *градуировочном* стандартном растворе;

$A_{try,sam}$ — площадь пика триптофана в экстракте или гидролизате;

V_{try} — объем концентрированного раствора триптофана, добавленный в градуировочный стандартный раствор, *см³* (2,00 *см³*);

c_{try} — молярная концентрация концентрированного раствора триптофана, добавленного в *градуировочный* стандартный раствор, г/*см³* (2,50 г/*см³*);

$V_{is,sam}$ — объем концентрированного раствора внутреннего стандарта, добавленный в экстракт или гидролизат, *см³* (5,00 или 2,00 *см³* соответственно);

100 — коэффициент пересчета в проценты;

$A_{is,sam}$ — площадь пика внутреннего стандарта в экстракте или гидролизате;

$A_{try,cal}$ — площадь пика триптофана в стандартном растворе;

$V_{is,cal}$ — объем концентрированного раствора внутреннего стандарта, добавленный в *градуировочный* стандартный раствор, *см³* (2,00 *см³*);

m — масса анализируемой пробы (с поправкой на первоначальную массу, для сухих и/или обезжиренных образцов), г.

11 Прецизионность

11.1 Межлабораторные испытания

Результаты межлабораторных испытаний *прецизионности метода* приведены в приложении *Б*. Значения, полученные в этих межлабораторных испытаниях, не могут быть применимы к диапазонам концентраций и *пробам*, отличающимся от описанных в настоящем стандарте.

11.2 Повторяемость

Абсолютное *расхождение* между результатами двух отдельных независимых испытаний, полученными одним и тем же методом на одной испытуемой пробе в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором на одном и том же *экземпляре* оборудования в течение короткого промежутка времени, не должно превышать предел повторяемости (*r*), указанный в таблицах *Б*.1—*Б*.3, более чем в 5 % случаев.

11.3 Воспроизводимость

Абсолютное *расхождение* между результатами двух отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом на одной испытуемой пробе в разных лабораториях разными операторами на различных *экземплярах* оборудования, не должно превышать предела воспроизводимости (*R*), указанного в таблицах *Б*.1—*Б*.3, более чем в 5 % случаев.

12 Протокол испытания

Протокол испытания *должен содержать следующую информацию*:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации *пробы*;
- используемый метод отбора проб, если известен;
- используемый метод *определения* со ссылкой на настоящий стандарт;
- все детали испытаний, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как *несущественные*, которые могли повлиять на результат(ы) испытания;
- полученный результат испытания или *среднеарифметическое значение результатов* двух испытаний, если проверена повторяемость.

Приложение А
(справочное)

Уточнения по выполнению измерений

А.1 Лучшее разделение между триптофаном и α-метилтриптофаном могут дать специальные условия хроматографии.

Условия изократического элюирования с последующим градиентом промывки колонки *приведены в таблице А.1.*

Таблица А.1

Наименование параметра	*Значение и характеристика параметра*
Жидкостная хроматографическая колонка	125 × 4 мм, с наполнителем C_{18}, с размером частиц 5 мкм или эквивалентным
Температура колонки	32 °С
Подвижная фаза	А: раствор калия фосфорнокислого однозамещенного молярной концентрации 0,01 моль/*дм*^{3}/метанол в объемном соотношении 95:5; *Б*: метанол
Программа градиента	0 мин 100 % А 0 % *Б* 15 мин 100 % А 0 % *Б* 17 мин 60 % А 40 % *Б* 19 мин 60 % А 40 % *Б* 21 мин 100 % А 0 % *Б* 33 мин 100 % А 0 % *Б*
Скорость потока	1,2 *см*^{3}/мин
Общее время работы	Около 33 мин

А.2 Хроматография будет варьироваться в зависимости от типа используемого наполнителя ВЭЖХ колонки. Выбранная система должна давать достаточное разделение между триптофаном и внутренним стандартом. Кроме того, важно, чтобы продукты гидролиза хорошо отделялись от триптофана и внутреннего стандарта. Для подтверждения правильности выбора основного пика должен быть проанализирован гидролизат без внутреннего стандарта. Важно, чтобы время выполнения анализа было достаточно длительным для элюирования всех продуктов разложения, иначе поздно элюированные пики могут помешать при последующих запусках хроматографии.

Хроматография должна давать линейную зависимость во всем диапазоне измерений. Линейность следует проверять с постоянной (нормальной) массовой концентрацией внутреннего стандарта и различными массовыми концентрациями триптофана. Важно, чтобы размер пиков триптофана и внутреннего стандарта были в пределах линейного диапазона ВЭЖХ/флуоресценции системы. Если один из пиков триптофана и/или внутреннего стандарта(ов), слишком мал или слишком велик, анализ следует повторить с другой массовой концентрацией и/или с измененным конечным объемом.

А.3 Со временем гидроксид бария растворяется хуже. В результате неочищенный раствор для определения ВЭЖХ может привести к ухудшению результатов определения триптофана.

Приложение Б
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Межлабораторные испытания были организованы в рамках Европейского союза, в которых определение *общего* триптофана, извлеченного с помощью гидролиза, было проведено на трех пробах в 12 лабораториях. Для каждой пробы было проведено пять повторных анализов. Результаты приведены в таблице *Б.1.*

Таблица *Б.1*

Наименование показателя	Проба 1. Корм для свиней	Проба 2. Корм для свиней, обогащенный L-триптофаном	Проба 3. Концентрированный корм для свиней
Количество лабораторий, представивших результаты	12	12	12
Количество приемлемых результатов испытаний лабораторий	50	55	50
Среднее значение $\bar{x}$, г/кг	2,42	3,40	4,22
Стандартное отклонение повторяемости s_r, г/кг	0,05	0,05	0,08
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	1,9	1,6	1,9
Предел повторяемости r (= 2,8s_r), г/кг	0,14	0,14	0,22
Стандартное отклонение воспроизводимости s_r, г/кг	0,15	0,20	0,09
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	6,3	6,0	2,2
Предел воспроизводимости, R (= 2,8s_R), г/кг	0,42	0,56	0,25

В других межлабораторных испытаниях определение свободного триптофана с помощью экстракции было проведено на двух пробах в 13 аккредитованных лабораториях. Для каждого образца было проведено пять повторных анализов. Результаты приведены в таблице *Б.2.*

Таблица *Б.2*

Наименование показателя	Проба 4. Смесь пшеницы и сои	Проба 5. Смесь пшеницы и сои (образец 4) с добавлением триптофана (0,457 г/кг)
Количество лабораторий, представивших результаты	12	12
Количество приемлемых результатов испытаний лабораторий	55	60
Среднее значение $\bar{x}$, г/кг	0,391	0,931
Стандартное отклонение повторяемости s_r, г/кг	0,005	0,012
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	1,34	1,34
Предел повторяемости r (= 2,8s_r), г/кг	0,014	0,034
Стандартное отклонение воспроизводимости s_r, г/кг	0,018	0,048
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	4,71	5,11
Предел воспроизводимости R (= 2,8s_R), г/кг	0,05	0,134

В-третьих межлабораторных испытаниях определение *общего* триптофана с помощью гидролиза было проведено на четырех пробах в семи аккредитованных лабораториях. Для каждого образца было проведено пять повторных анализов. Результаты приведены в таблице *Б.3.*

Таблица *Б.3*

Наименование показателя	Проба 1. Комбикорма для свиней (CRM 117)	Проба 2. Корм для нежирной рыбы (CRM 118)	Проба 3. Корм из сои (CRM 119)	Проба 4. Сухое обезжиренное молоко (CRM 120)
Количество лабораторий, представивших результаты	7	7	7	7
Количество приемлемых результатов испытаний лабораторий	25	30	30	30
Среднее значение $\bar{x}$, г/кг	2,064	8,801	6,882	5,236
Стандартное отклонение повторяемости s_r, г/кг	0,021	0,101	0,089	0,040
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	1,04	1,15	1,30	0,76
Предел повторяемости r (= 2,8s_r), г/кг	0,059	0,283	0,249	0,112
Стандартное отклонение воспроизводимости s_r, г/кг	0,031	0,413	0,283	0,221
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	1,48	4,69	4,11	4,22
Предел воспроизводимости R (= 2,8s_R), г/кг	0,087	1,156	0,792	0,619

Приложение ДА
(справочное)

Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта

Таблица ДА.1

Структура международного стандарта		*Структура межгосударственного стандарта*	
подраздел	*пункт*	*подраздел*	*пункт*
Раздел 1		*Раздел 1*	
—		*Раздел 2*	
Раздел 2		*Раздел 3*	
Раздел 3		*Разделы 5, 6*	
3.1	—	*5.1*	—
3.2	—	*5.2*	—
3.3	—	*5.3*	—
—	—	*5.4*	—
3.4	—	5.5	—
3.5	—	*5.6*	—
3.6	—	*5.7*	—
3.7	—	*5.8*	—
3.8	—	*5.9*	—
—	—	*5.10*	—
3.9	—	*5.11*	—
3.10	—	*6.1*	—
3.11	—	*6.2*	—
3.12	—	*6.3*	—
3.13	—	*6.4*	—
3.14	—	*6.5*	—
3.15	—	*6.6*	—
3.16	—	*6.7*	—
3.17	—	*6.8*	—
3.18	—	*5.11*	—
3.19	—	*6.9*	—
3.20	—	*6.10*	—
Раздел 4		*Раздел 4*	
4.1	—	*4.1*	—
4.2	—	*4.2*	—
4.3	—	*4.3*	—
4.4	—	*4.4*	—
4.5	—	*4.5*	—
4.6	—	*4.6*	—
4.7	—	*4.7*	—

Окончание таблицы ДА.1

Структура международного стандарта		*Структура межгосударственного стандарта*	
подраздел	*пункт*	*подраздел*	*пункт*
4.8	—	*4.8*	—
—	—	*4.9*	—
—	—	*4.10*	—
—	—	*4.11*	—
—	—	*4.12*	—
—	—	*4.13*	—
—	—	*4.14*	—
—		*Раздел 7*	
Раздел 5		*Разделы 8, 9*	
5.1	—	*Раздел 8*	
5.2	—	*9.1*	—
5.3	—	*9.2*	—
5.4	—	*9.3*	—
Раздел 6		*Раздел 10*	
Раздел 7		*Раздел 11*	
Раздел 8		*Раздел 12*	
—		Приложение ДА (справочное) Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта	

Примечания

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

2 Раздел 3 международного стандарта «Реактивы и материалы» представлен в настоящем стандарте разделом 5 «Реактивы» и разделом 6 «Приготовление растворов».

3 В раздел 5 настоящего стандарта введены подразделы с неуказанными в международном стандарте реактивами.

4 Раздел 4 настоящего стандарта дополнен подразделами с указанием используемого оборудования.

5 В раздел 4 настоящего стандарта добавлены подразделы 4.9—4.14 с учетом требований к используемому дополнительному оборудованию для проведения испытания в России.

6 В соответствии с ГОСТ 1.5—2001 в настоящий стандарт добавлен раздел 7 «Отбор проб».

7 В соответствии с ГОСТ 1.5—2001 подраздел 5.1 международного стандарта «Подготовка образцов» в настоящем стандарте представлен разделом 7 «Подготовка проб».

8 В соответствии с ГОСТ 1.5—2001 и ГОСТ 1.3—2008 в настоящий стандарт добавлено приложение ДА (справочное) «Сравнение структуры международного стандарта со структурой межгосударственного стандарта».

Библиография

[1] Commission Directive 2000/45/EC of 6 July 2000, establishing Community methods of analysis for the determination of vitamin A, vitamin E and tryptophan in feedingstuffs

УДК 636.085.3:006.354 МКС 65.120 С19 MOD

Ключевые слова: корма, комбикорма, метод, триптофан, экстракция, щелочной гидролиз, обратно-фазная ВЭЖХ

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *Е.В. Беспрозванная*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 17.10.2014. Подписано в печать 06.11.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40. Тираж 50 экз. Зак. 4433.

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

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

gost.e-ecolog.ru