ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 55569— 2013

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП»), Обществом с ограниченной ответственностью «ЛЮМЭКС-МАРКЕТИНГ» (ООО «ЛЮМЭКС-МАРКЕТИНГ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 004 «Комбикорма, белково-витаминно-минеральные концентраты, премиксы»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 06 сентября 2013 г. № 841–ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (gost.ru)

© Стандартинформ, 2014

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Определение протеиногенных аминокислот методом капиллярного электрофореза

Feedstuffs, compound feeds, feed raw materials. Determination of proteinogenic amino acids using capillary electrophoresis

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, комбикорма и комбикормовое сырье и устанавливает метод определения массовой доли протеиногенных аминокислот в форме фенилизотиокарбамильных производных (далее – ФТК-производных) с помощью капиллярного электрофореза.

Методика измерений позволяет определять общее содержание (свободные и связанные формы в сумме) отдельных аминокислот в пробах. Поскольку в процессе разложения проб аспарагин и глутамин количественно гидролизуются до аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно, то данные по содержанию аспарагиновой и глутаминовой кислот представляют собой суммарное содержание этих кислот и соответствующих амидов. В условиях проведения измерений лейцин и изолейцин не разделяются, поэтому предусмотрено их суммарное определение.

Стандарт позволяет определять содержание аминокислот в следующих диапазонах измерений:

- аланин (Ala) от 0,25 до 10,0 включ., %
- аргинин (Arg) от 0,5 до 10,0 включ., %
- аспарагиновая кислота и аспарагин в сумме (Asp, Asn) от 0,5 до 10,0 включ., %
- валин (Val) от 0,5 до 10,0 включ., %
- гистидин (His) от 0,5 до 10,0 включ., %
- глицин (Gly) от 0,25 до 10,0 включ., %
- глутаминовая кислота и глутамин в сумме (Glu, Gln) от 0,5 до 10,0 включ., %
- лейцин и изолейцин в сумме (Leu, Ile) от 0,25 до 10,0 включ., %
- лизин (Lys) от 0,25 до 20,0 включ., %
- метионин (Met) от 0,25 до 10,0 включ., %
- пролин (Pro) от 0,25 до 10,0 включ., %
- серин (Ser) от 0,25 до 10,0 включ., %
- тирозин (Tyr) от 0,25 до 10,0 включ., %
- треонин (Thr) от 0,5 до 10,0 включ., %
- фенилаланин (Phe) от 0,25 до 10,0 включ., %
- цистин (Cys-Cys) от 0,1 до 10,0 включ., %.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие 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 12.2.007.0–75 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

Издание официальное

ГОСТ 84–76 Реактивы. Натрий углекислый 10-водный. Технические условия

ГОСТ 177–88 Водорода перекись. Технические условия

ГОСТ 245–76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. 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 4172–76 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный. Технические условия

ГОСТ 4204–77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4461–77 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия

ГОСТ 5848–73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

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 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 14919–83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 16317–87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17681–82 Мука животного происхождения. Методы испытаний

ГОСТ 19908–90 Тигли, чаши, стаканы, колбы, воронки, пробирки и наконечники из прозрачного кварцевого стекла. Общие технические условия

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

ГОСТ 27668–88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб

ГОСТ 28311–89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-1–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р ИСО 5725-6–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р ИСО 6497–2011 Корма для животных. Отбор проб

ГОСТ Р ИСО 7886-1–2009 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ Р 51419–99 (ИСО 6498–98) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб

ГОСТ Р 53228–2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Сущность метода заключается в разложении пробы для анализа кислотным гидролизом с переводом аминокислот в свободные формы, получении ФТК-производных аминокислот, дальнейшем их разделении и количественном определении методом капиллярного электрофореза.

Метод предусматривает две схемы испытаний (см. 7.1), которые различаются процедурой подготовки пробы, условиями электрофоретического определения и перечнем определяемых аминокислот.

4 Требования техники безопасности

4.1 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 Р 12.1.019 и ГОСТ 12.2.007.0, а также требования, изложенные в технической документации на используемые приборы.

4.2 Работа с химическими реактивами должна проводиться в вытяжном шкафу.

4.3 Помещение должно быть оснащено вентиляционными системами по ГОСТ 12.4.021, средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009 и соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004.

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

5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

5.1 Средства измерений

5.1.1 Система (анализатор) капиллярного электрофореза (далее – прибор) с источником высокого напряжения положительной полярности, оснащенная кварцевым капилляром длиной 75 см и внутренним диаметром 50 мкм, фотометрическим или спектрофотометрическим детектором, позволяющим проводить измерения при длине волны от 250 до 260 нм, и компьютером со специальным программным обеспечением для регистрации и обработки электрофореграмм, например, система капиллярного электрофореза «Капель» с программным обеспечением «Эльфоран», в Государственном реестре средств измерений зарегистрирована за № 17727-06*.

5.1.2 Весы, обеспечивающие точность взвешивания с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,1 мг по ГОСТ Р 53228.

5.1.3 Колбы мерные 2(2а)–25(50, 100)–2 по ГОСТ 1770.

5.1.4 Пипетки градуированные 1(2, 3, 5)–1(1а, 2, 2а)–2–5(10) по ГОСТ 29227.

5.1.5 Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема 10–100 мм^3, 100–1000 мм^3, 1000–5000 мм^3 по ГОСТ 28311.

5.1.6 Цилиндры мерные 1(2)–25(250) по ГОСТ 1770.

5.1.7 pH-метр лабораторный (абсолютная погрешность измерения не более ± 0,05 единиц pH).

Примечания

1 Средства измерений должны быть поверены в установленные сроки.

2 Допускается использование других средств измерений, имеющих аналогичные или лучшие метрологические характеристики.

5.2 Вспомогательные устройства и материалы

5.2.1 Дистиллятор или аппарат для перегонки воды (кварцевый или стеклянный).

5.2.2 Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 об/мин.

5.2.3 Шкаф сушильный с рабочей температурой не ниже 150 °С и точностью поддержания температуры не более ± 2 °С.

5.2.4 Холодильник бытовой – по ГОСТ 16317.

5.2.5 Вентилятор бытовой, обеспечивающий поток теплого воздуха.

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

---

* Информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не содержит обязательств применять оборудование данной марки.

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

5.2.8 Виалы с завинчивающими крышками вместимостью 10–40 $см^3$.

5.2.9 Полиэтиленовые емкости вместимостью 50, 100 $см^3$.

5.2.10 Стаканчики для взвешивания СВ-14/8(19/9) – по ГОСТ 25336.

5.2.11 Кварцевые чаши 20 (40, 50) по ГОСТ 19908 или выпарительные чашки 1 (2) по ГОСТ 9147.

5.2.12 Стаканы В-1(2)-250 (500)-ТХС по ГОСТ 25336.

5.2.13 Баня водяная с регулятором нагрева.

5.2.14 Электроплитка бытовая – по ГОСТ 14919.

5.2.15 Шприц медицинский одноразовый вместимостью 10 (20) $см^3$ по ГОСТ Р ИСО 7886-1.

5.2.16 Фильтры обеззоленные «синяя лента».

5.2.17 Оправа для фильтра, например, производства фирмы «Sartorius Stedim»* с целлюлозно-ацетатными фильтрами (размер пор 0,2 мкм, диаметр 25 мм) или шприцевые одноразовые фильтры (размер пор 0,2 мкм, диаметр 25 мм, ацетат целлюлозы), например, «Minisart» производства фирмы «Sartorius Stedim»*.

5.3 Реактивы

5.3.1 Вода дистиллированная – по ГОСТ 6709.

5.3.2 Гидроокись натрия – по ГОСТ 4328, х. ч.

5.3.3 Соляная кислота – по ГОСТ 3118, х. ч.

5.3.4 Спирт изопропиловый (2-пропанол) – по ГОСТ 9805, абсолютизированный.

5.3.5 Натрий углекислый 10-водный – по ГОСТ 84, х. ч.

5.3.6 Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный – по ГОСТ 4172, х. ч.

5.3.7 Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный – по ГОСТ 245 или моногидрат, ч. д. а.

5.3.8 Муравьиная кислота – по ГОСТ 5848, ч. д. а.

5.3.9 Пероксид водорода – по ГОСТ 177, 30 %, медицинский.

5.3.10 Набор L-аминокислот, например, набор LAA-21 производства фирмы «Sigma»*.

5.3.11 Моногидрат цистеиновой кислоты, например, производства фирмы «Sigma»*.

5.3.12 Фенилизотиоцианат, например, производства фирмы «Acros Organics»*, кат. номер 16097.

5.3.13 β-циклодекстрин, например, производства фирмы «Fluka»*, кат. номер 28707.

5.3.14 Серная кислота – по ГОСТ 4204, х. ч.

5.3.15 Азотная кислота – по ГОСТ 4461, х. ч.

Примечание – Допускается использование реактивов аналогичной или более высокой квалификации, в том числе импортных *по качеству не ниже указанных.*

6 Подготовка к проведению испытаний

6.1 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.

6.2 Отбор и подготовка проб

6.2.1 Отбор проб по ГОСТ Р ИСО 6497, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 17681, ГОСТ 27668 или в соответствии с другими нормативными документами на исследуемые продукты.

6.2.2 Подготовка проб к испытанию – по ГОСТ Р 51419.

6.3 Подготовка лабораторной посуды

Лабораторную посуду моют только серной (см. 5.3.4) или азотной кислотой (см. 5.3.15), без применения других моющих средств, тщательно промывают водопроводной и ополаскивают дистиллированной водой. Запрещается использовать для мытья посуды хромовую смесь.

---

* Информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не содержит обязательств применять оборудование и материалы только данной фирмы.

6.4 Приготовление растворов

6.4.1 Приготовление раствора гидроксида натрия для промывания капилляра

В стакан из термостойкого стекла вместимостью 250 $см^3$ (см. 5.2.12) помещают 2 г гидроксида натрия (см. 5.3.2) и добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1).

Срок хранения раствора в полиэтиленовой емкости (см. 5.2.9) – не более 6 мес.

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

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ (см. 5.1.3) пипеткой (см. 5.1.4) вносят 8,3 $см^3$ соляной кислоты (см. 5.3.3) и доводят до метки дистиллированной водой (см. 5.3.1).

Срок хранения раствора не ограничен.

6.4.3 Приготовление раствора фосфорно-кислого натрия двузамещенного

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ (см. 5.1.3) помещают (4,78 ± 0,05) г 12-водного фосфорно-кислого натрия двузамещенного (см. 5.3.8), добавляют 50–60 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1), перемешивают до полного растворения, затем доводят объем до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора – не более 2 мес.

6.4.4 Приготовление раствора фосфорно-кислого натрия однозамещенного

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ (см. 5.1.3) помещают (2,28 ± 0,05) г моногидрата однозамещенного фосфорно-кислого натрия (см. 5.3.9), добавляют 50–60 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1), перемешивают до полного растворения, затем доводят объем до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора – не более 2 мес.

Примечание – Для приготовления раствора можно использовать также дигидрат однозамещенного фосфорно-кислого натрия, в этом случае его масса для приготовления раствора объемом 100 $см^3$ составит (2,57 ± 0,05) г.

6.4.5 Приготовление запасного фосфатного буферного раствора

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ (см. 5.1.3) вносят 50 $см^3$ раствора фосфорно-кислого натрия двузамещенного (см. 6.4.3) и 5,0 $см^3$ раствора фосфорно-кислого натрия однозамещенного (см. 6.4.4), перемешивают, доводят до метки дистиллированной водой. Значение pH полученного раствора составляет 7,7–7,8.

6.4.6 Приготовление раствора β-циклодекстрина

В мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ (см. 5.1.3) вносят (0,570 ± 0,005) г β-циклодекстрина (см. 5.3.15), добавляют 25–30 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1) и перемешивают. При необходимости колбу нагревают на теплой водяной бане (см. 5.2.13) при температуре не более 50 °С и после полного растворения объем доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора – не более 2 мес.

6.4.7 Приготовление электролита

В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ (см. 5.3.1) вносят 10 $см^3$ раствора β-циклодекстрина (см. 6.4.6), добавляют 10 $см^3$ запасного фосфатного буферного раствора (см. 6.4.5), доводят до метки дистиллированной водой (см. 5.3.1) и перемешивают. Приготовленный раствор электролита содержит 30 ммоль/$дм^3$ фосфат-ионов и 4 ммоль/$дм^3$ β-циклодекстрина.

Срок хранения раствора – не более 2 недель.

6.4.8 Приготовление раствора соляной кислоты, разбавленной в соотношении 1:1 по объему

В химическом термостойком стакане вместимостью 500 $см^3$ (см. 5.2.12) смешивают 250 $см^3$ концентрированной соляной кислоты с равным объемом дистиллированной воды (см. 5.3.1).

Срок хранения раствора не ограничен.

6.4.9 Приготовление раствора углекислого натрия молярной концентрации *c* (Na_2CO_3) = 0,1 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ (см. 5.1.3) вносят (0,715 ± 0,005) г 10-водного углекислого натрия (см. 5.3.7), добавляют 15 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1), перемешивают до полного растворения, затем доводят объем до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора в полиэтиленовой емкости – не более 2 мес.

6.4.10 Приготовление раствора фенилизотиоцианата

В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ (см. 5.1.3) вносят 0,40 $см^3$ фенилизотиоцианата (далее – ФИТЦ) (см. 5.3.14), доводят до метки изопропиловым спиртом (см. 5.3.6) и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в холодильнике (см. 5.2.4) при температуре от 2 °С до 8 °С в емкости

из темного стекла с завинчивающейся крышкой – не более 2 мес.

Примечание – Вся работа по приготовлению раствора ведется в перчатках в вытяжном шкафу.

6.4.11 Приготовление окислительной смеси

В стеклянной емкости с крышкой (см. 5.2.8) смешивают одну объемную часть 30 %-ного пероксида водорода и девять объемных частей концентрированной муравьиной кислоты, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в вытяжном шкафу и используют в день приготовления.

6.5 Приготовление градуировочных и контрольных растворов

6.5.1 Все растворы, приготовленные в соответствии с пунктом 6.5, хранят в холодильнике (см. 5.2.4) при температуре от 2 °С до 8 °С.

Допускается отклонение массы взвешенных аминокислот от указанных ниже в пределах ± 0,001 г. При этом массовую концентрацию аминокислоты в растворе уточняют в соответствии с фактической массой.

6.5.2 Приготовление запасных растворов аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, пролина, серина, треонина

В отдельные виалы вместимостью 10 $см^3$ (см. 5.2.8) помещают аминокислоты (см. 5.3.12), масса которых составляет:

- для аргинина в форме гидрохлорида аргинина (0,0242 ± 0,0001) г;
- для гистидина в форме моногидрата гидрохлорида гистидина (0,0270 ± 0,0001) г;
- для лизина в форме гидрохлорида лизина (0,0249 ± 0,0001) г;
- для остальных аминокислот (0,0200 ± 0,0001) г.

В каждую виалу добавляют пипеткой (см. 5.1.4) или дозатором (см. 5.1.5) 5,0 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1) и перемешивают до растворения аминокислоты. При необходимости растворы нагревают на водяной бане (см. 5.1.13) при температуре 60 °С – 70 °С.

Массовая концентрация аминокислот в запасных растворах – 4,0 $г/дм^3$.

Срок хранения запасных растворов аспарагиновой и глутаминовой кислот – не более 1 мес.

Срок хранения запасных растворов остальных аминокислот – не более 4 мес.

Примечание – Признаком непригодности растворов аспарагиновой и глутаминовой кислот является выпадение аморфного осадка, нерастворимого при нагревании.

6.5.3 Приготовление запасных растворов фенилаланина, тирозина

В отдельные виалы вместимостью 20 $см^3$ (см. 5.2.8) помещают (0,0100 ± 0,0001) г соответствующей аминокислоты (см. 5.3.12), добавляют 1,0 $см^3$ раствора соляной кислоты (см. 6.4.2), 9,0 $см^3$ дистиллированной воды 0 (см. 5.3.1) и перемешивают содержимое до полного растворения. При необходимости растворы нагревают на водяной бане (см. 5.1.13) при температуре 60 °С – 70 °С.

Массовая концентрация аминокислот в запасных растворах – 1,0 $г/дм^3$.

Срок хранения запасных растворов аминокислот – не более 2 мес.

6.5.4 Приготовление запасного раствора цистина (в форме цистеиновой кислоты)

В стаканчик для взвешивания (далее – бюкс) (см. 5.2.10) помещают (0,0400 ± 0,0001) г цистина (см. 5.3.12), приливают 1,0 $см^3$ окислительной смеси (см. 6.4.11), перемешивают до растворения и выпаривают раствор досуха в токе теплого воздуха. Сухой остаток растворяют в 10 $см^3$ дистиллированной воды и переносят в стеклянную емкость с плотно завинчивающейся крышкой для хранения.

Массовая концентрация цистина (в форме цистеиновой кислоты) в запасном растворе – 4,0 $г/дм^3$.

Для приготовления запасного раствора цистина допускается использовать моногидрат цистеиновой кислоты (см. 5.3.13).

Срок хранения запасного раствора цистина – не более 3 мес.

6.5.5 Приготовление раствора смеси аминокислот по схеме испытаний 1 (см.7.1)

В стеклянную емкость с герметичной крышкой (см. 5.2.8) вводят дозатором (см. 5.1.5) по 0,05 $см^3$ запасных растворов аланина, аргинина, валина, гистидина, глицина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, пролина, серина и треонина (см. 6.5.2), по 0,2 $см^3$ растворов фенилаланина и тирозина (см. 6.5.3), добавляют 1,0 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1), тщательно перемешивают.

Номинальные значения массовой концентрации каждой аминокислоты в смеси – 100 $мг/дм^3$.

Срок хранения приготовленного раствора – не более 2 недель.

6.5.6 Приготовление раствора смеси аминокислот по схеме испытаний 2 (см. 7.1)

В стеклянную емкость с герметичной крышкой (см. 5.2.8) вводят по 0,05 $см^3$ запасных растворов аспарагиновой и глутаминовой кислот (см. 6.5.2) и раствора цистина в форме цистеиновой кислоты

(см. 6.5.4), добавляют дозатором 1,85 см^3 дистиллированной воды (см. 5.3.1) и тщательно перемешивают.

Номинальные значения массовой концентрации каждой аминокислоты в смеси – 100 мг/дм^3.

Срок хранения приготовленного раствора – не более 2 недель.

6.5.7 Приготовление контрольного и градуировочных растворов смеси аминокислот по схеме испытаний 1 (см. 7.1)

В четыре стеклянных бюкса (см. 5.2.10) помещают раствор смеси аминокислот (см. 6.5.5) в объемах, указанных в таблице 1. Проводят реакцию получения ФТК-производных аминокислот согласно 6.5.9. Полученные сухие остатки растворяют в 0,5 см^3 дистиллированной воды (см. 5.3.1) и переносят в пробирку типа Эппендорф (см. 5.2.6).

Номинальные значения массовой концентрации каждой аминокислоты в соответствующем градуировочном и контрольном растворе представлены в таблице 1.

Растворы готовят в день проведения испытаний.

Таблица 1 – Рабочие градуировочные и контрольный растворы

Обозначение раствора	Объем смеси аминокислот, см^3	Массовая концентрация каждой аминокислоты в растворе, мг/дм^3
Градуировочный раствор № 1	0,1	20
Градуировочный раствор № 2	0,2	40
Градуировочный раствор № 3	0,3	60
Контрольный раствор	0,15	30

Примечания

1 Градуировочные и контрольный растворы представляют собой смеси ФТК-производных соответствующих аминокислот, однако для удобства массовые концентрации указаны в пересчете на аминокислоты.

2 Допускается использование иных по количественному составу градуировочных и контрольного растворов.

3 Запрещается исключать из состава смеси какие-либо компоненты.

6.5.8 Приготовление контрольного и градуировочных растворов аминокислот по схеме испытаний 2 (см. 7.1)

В четыре стеклянных бюкса (см. 5.2.8) помещают раствор смеси аминокислот (см. 6.5.6) в соответствии с таблицей 1. Проводят реакцию получения ФТК-производных аминокислот согласно 6.5.9. Сухие остатки растворяют в 0,5 см^3 дистиллированной воды (см. 5.3.1) и переносят в пробирку типа Эппендорф (см. 5.2.6).

Номинальные значения массовой концентрации каждой аминокислоты в соответствующем градуировочном и контрольном растворе представлены в таблице 1.

Растворы готовят в день проведения испытаний.

6.5.9 Получение ФТК-производных

В каждый стеклянный бюкс с растворами аминокислот (см. 6.5.7–6.5.8) добавляют 0,15 см^3 раствора углекислого натрия (см. 6.4.9), 0,3 см^3 раствора ФИТЦ (см. 6.4.10). Тщательно перемешивают до растворения осадка, закрывают крышкой и оставляют на 35 мин при комнатной температуре. Затем растворы выпаривают досуха в струе теплого воздуха (см. 5.2.5).

Необходимо строго соблюдать последовательность добавляемых растворов при получении ФТК-производных аминокислот.

Примечание – При получении ФТК-производных аминокислот градуировочного раствора № 3, в случае нерастворения осадка, допускается увеличить объем раствора углекислого натрия (см. 6.4.9) до 0,2 см^3 и раствора ФИТЦ (см. 6.4.10) до 0,4 см^3.

Срок хранения сухих остатков в закрытых бюксах – не более 3 дней.

6.6 Подготовка капилляра к работе

6.6.1 Подготовка нового капилляра

Подготовку нового капилляра к работе проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации прибора. При отсутствии в руководстве (инструкции) указаний по подготовке нового капилляра его последовательно промывают дистиллированной водой (см. 5.3.1), раствором соляной кислоты

(см. 6.4.2), дистиллированной водой, раствором гидроксида натрия (см. 6.4.1), дистиллированной водой (см. 5.3.1) и электролитом (см. 6.4.7). Продолжительность промывки водой и каждым из указанных растворов 10 мин.

6.6.2 Подготовка капилляра к работе

Перед проведением измерений капилляр последовательно промывают дистиллированной водой (см. 5.3.1) в течение 3 мин, раствором гидроксида натрия (см. 6.4.1) в течение 5 мин, дистиллированной водой (см. 5.3.1) в течение 5 мин, затем электролитом (см. 6.4.7) в течение 10 мин.

6.6.3 Подготовка капилляра между измерениями и в конце рабочего дня

Непосредственно перед проведением измерений градуировочных растворов и подготовленных проб капилляр и после проведения измерений промывают электролитом (см. 6.4.7) в течение 3 мин.

При работе с подготовленными пробами на электрофореграмме могут наблюдаться дрейф базовой линии и появление ступеней. В этом случае рекомендуется:

- увеличить продолжительность промывания капилляра электролитом между измерениями;
- промыть капилляр электролитом при рабочем напряжении в течение 3 мин;
- заменить электролит в пробирках на входе и на выходе свежими порциями;
- промыть капилляр в следующей последовательности: дистиллированной водой в течение 3 мин, раствором гидроксида натрия – 5 мин, дистиллированной водой - 3 мин и электролитом – 10 мин.

После завершения измерений капилляр промывают дистиллированной водой (см. 5.3.1) в течение 2 мин, раствором соляной кислоты (см. 6.4.2) – 5 мин, дистиллированной водой (см. 5.3.1) – 5 мин и оставляют концы капилляра погруженными в пробирки с дистиллированной водой.

6.6.4 Условия хранения капилляра

Если перерыв в работе составляет не более 14 сут, то перед хранением капилляр последовательно промывают дистиллированной водой (см. 5.3.1) в течение 2 мин, раствором соляной кислоты (см. 6.4.2) – 5 мин, дистиллированной водой (см. 5.3.1) – 5 мин.

После промывки концы капилляра оставляют погруженными в пробирки с дистиллированной водой.

Если перерыв в работе составляет более 14 сут, то перед хранением капилляр последовательно промывают дистиллированной водой (см. 5.3.1) в течение 2 мин, раствором гидроксида натрия (см. 6.4.1) – 5 мин, дистиллированной водой (см. 5.3.1) – 5 мин, раствором соляной кислоты (см. 6.4.2) – 5 мин, дистиллированной водой (см. 5.3.1) – 10 мин.

Затем капилляр продувают воздухом в течение 10 мин. Хранят капилляр в сухом состоянии, перед использованием подготавливают к работе в соответствии с требованиями 6.6.1.

6.7 Градуировка системы и контроль стабильности градуировочной характеристики

6.7.1 Каждой схеме испытаний (см. 7.1) должны соответствоватьсвой метод в программном обеспечении, свои градуировочные и контрольный растворы.

6.7.2 Градуировка системы

Перед измерением все растворы центрифугируют в течение 5 мин со скоростью вращения 5000 об/мин.

Непосредственно перед анализом готовят капилляр в соответствии с 6.6.1–6.6.3.

Между анализами капилляр подготавливают согласно с 6.6.3.

В зависимости от выбранной схемы испытаний (см. 7.1) регистрируют электрофореграммы соответствующих градуировочных растворов в условиях, указанных в таблице 2.

Примеры электрофореграмм градуировочных растворов и анализируемых проб приведены в приложении А.

Таблица 2 – Условия проведения измерений

Наименование параметра	Значение параметра	
	по схеме испытаний 1*	по схеме испытаний 2**
Длина волны, нм	254	
Температура, °С	30	
Ввод пробы: - давление, мбар - время ввода, с	 30 5	
Напряжение, кВ	25	
Давление во время анализа, мбар	0	50

Окончание таблицы 2

Наименование параметра	Значение параметра	
	по схеме испытаний 1*	по схеме испытаний 2**
Время анализа, мин	13–15	10–12
* Определяемые аминокислоты в порядке выхода: Arg, Lys, Tyr, Phe, His, Leu +Ile, Met, Val, Pro, Thr, Ser, Ala, Gly; используется градуировочный раствор по 6.5.7 ** Определяемые амнокислоты в порядке выхода: Glu, Asp, Cys-Cys (по пику цистеиновой кислоты), используется градуировочный раствор по 6.5.8		

Примечания

1 В указанных условиях проведения измерений лейцин и изолейцин не разделяются, при необходимости определения отдельных аминокислот лейцина и изолейцина анализ проводят согласно схеме испытаний 1 (см. таблицу 2), устанавливая при этом рабочую температуру 50 °С. В этом случае и градуировку системы следует провести в аналогичных условиях.

2 Необходимо через 5–7 вводов пробы пробирки на входе и выходе заново заполнять свежими порциями электролита.

На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков и, если необходимо, корректируют ее.

Далее обрабатывают электрофореграммы согласно процедуре градуировки в соответствии с Руководством пользователя программного обеспечения, используемого для сбора и обработки данных.

Градуировочная характеристика признается приемлемой при выполнении следующих условий:

- значение коэффициента корреляции, рассчитанное программой, не менее 0,99;
- относительное среднее квадратическое отклонение не превышает 7 % или отклонение в каждой точке градуировочной характеристики не превышает 14 %.

Допускается использовать дополнительные критерии приемлемости градуировочных характеристик в соответствии с рекомендациями разработчиков программного обеспечения.

При несоблюдении указанных требований находят причины несоответствий и устраняют их, после чего градуировку прибора проводят повторно.

При замене капилляра, после проведения ремонта или длительного простоя прибора, при смене партии хотя бы одного из компонентов электролита, изменении хотя бы одного из параметров проведения измерений (см. таблицу 2), а также получении неудовлетворительных результатов контроля стабильности градуировочной характеристики (см. 6.7.3) градуировку прибора проводят заново.

6.7.3 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводится в начале рабочего дня перед измерениями.

Для контроля стабильности градуировочной характеристики в зависимости от схемы испытаний используют соответствующий контрольный раствор аминокислот (см. 6.5.7, 6.5.8), который анализируют не менее двух раз в условиях, приведенных в таблице 2.

На полученных электрофореграммах проводят автоматическую идентификацию компонентов, установив ширину окна идентификации 5 %. При необходимости вносят программную коррекцию номера пика или времени миграции.

При помощи программного обеспечения вычисляют массовую концентрацию аминокислот в контрольном растворе для каждого ввода, используя действующую на данный момент градуировочную характеристику, построенную по 6.7.2, и оценивают приемлемость полученных значений согласно условию

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}10 \cdot \overline{X}\ , \qquad (1)$$

где $\overline{X}$ – среднеарифметическое значений массовой концентрации аминокислоты для двух последовательных вводов (X_1, X_2), мг/дм^3.

Градуировочная характеристика признается стабильной, если выполняется неравенство

$$|\overline{X} - C_к| \le 0{,}15 \cdot C_к, \qquad (2)$$

где $\overline{X}$ – среднеарифметическое значений массовой концентрации аминокислоты для двух последовательных вводов (X_1, X_2), мг/дм^3;

$C_к$ – массовая концентрация соответствующей аминокислоты в контроль ном растворе, мг/дм^3.

При невыполнении условий по формулам (1) и/или (2) промывают капилляр по 6.6.3, заново анализируют контрольный раствор еще два раза. При повторных отклонениях, превышающих

указанные нормативы, заново градуируют систему.

7 Проведение испытаний

7.1 Схемы испытаний

Испытания проводят в соответствии с выбранной схемой:

- схема испытаний 1 предназначена для определения аланина, аргинина, лизина, валина, гистидина, глицина, тирозина, лейцина и изолейцина (в сумме), метионина, пролина, серина, треонина, фенилаланина;
- схема испытаний 2 предназначена для определения аспарагина, глутамина, цистина.

Примечания

1 В процессе подготовки проб аспарагин и глутамин количественно гидролизуются до аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно, данные по содержанию аспарагиновой и глутаминовой кислот представляют собой суммарное содержание этих кислот и соответствующих амидов.

2 Цистин (Cys-Cys) является устойчивой формой протеиногенной аминокислоты цистеина (Cys). Цистин в условиях проведения измерений предварительно окисляют до цистеиновой кислоты, устойчивой к кислотному гидролизу.

7.2 Проведение гидролиза проб

Для определения аминокислот по схеме испытаний 1 анализируемую пробу массой (0,100 ± 0,001) г помещают в виалу для гидролиза (см. 5.2.7), добавляют 10,0 $см^3$ соляной кислоты (см. 6.4.8). Виалу для гидролиза герметично закрывают завинчивающейся крышкой и перемешивают.

Для определения аминокислот по схеме испытаний 2 анализируемую пробу массой (0,100 ± 0,001) г помещают в кварцевую или фарфоровую чашку (см. 5.2.11), добавляют 5,0 $см^3$ свежеприготовленной окислительной смеси по 6.4.11 и выпаривают при постоянном перемешивании в струе теплого воздуха при температуре 60 °С досуха. Сухой остаток количественно переносят в виалу для гидролиза (см. 5.2.7), используя 10,0 $см^3$ соляной кислоты (см. 6.4.8). Виалу для гидролиза герметично закрывают завинчивающейся крышкой и перемешивают.

Виалы для гидролиза устанавливают в сушильный шкаф (см. 5.2.3). Гидролиз проводят при температуре 110 °С в течение 14–16 ч.

По окончании гидролиза виалы для гидролиза вынимают из шкафа и охлаждают до комнатной температуры. Содержимое виал для гидролиза после охлаждения фильтруют через фильтры «синяя лента» (см. 5.2.16), отбросив первые порции и собирая фильтраты в посуду с крышками во избежание испарения. Далее переходят к получению ФТК-производных по 7.3.

7.3 Получение ФТК-производных аминокислот

В стеклянные бюксы (см. 5.2.10) вместимостью 10–15 $см^3$ отбирают по 0,05 $см^3$ подготовленных гидролизатов. Растворы выпаривают досуха в струе

теплого воздуха. В каждый бюкс с сухими остатками добавляют 0,15 $см^3$ раствора углекислого натрия (см. 6.4.9) и 0,3 $см^3$ раствора ФИТЦ (см. 6.4.10). Тщательно перемешивают до растворения осадка, закрывают крышкой и оставляют на 35 мин при комнатной температуре. Затем растворы выпаривают досуха в струе теплого воздуха.

Необходимо строго соблюдать последовательность добавляемых растворов при получении ФТК-производных аминокислот.

Сухие остатки растворяют в 0,5 $см^3$ дистиллированной воды (см. 5.3.1) и используют для анализа в течение рабочего дня.

Срок хранения сухих остатков в закрытых бюксах – не более 3 дней.

7.4 Проведение измерений

Подготовленные по 7.3 растворы переносят в пробирки типа Эппендорф (см. 5.2.6), центрифугируют (см. 5.2.2) в течение 5 мин при скорости вращения 5000 об/мин.

Капилляр готовят к работе в соответствии с 6.4.2, 6.4.3.

Для каждого подготовленного раствора регистрируют не менее двух электрофореграмм в условиях, указанных в таблице 2 для соответствующей схемы испытаний (см. 6.7.2). По окончании регистрации проверяют правильность автоматической разметки пиков. Используя программное обеспече-

ние, проводят идентификацию аминокислот в пробе по совпадению времен их миграции в пробе и контрольном растворе при ширине окна идентификации не более 5 %.

Если анализируемые аминокислоты обнаружены, то определяют их массовую концентрацию с использованием градуировочной характеристики, установленной по 6.7.2.

Для каждой из аминокислот проверяют выполнение условия по формуле (1).

Если измеренные значения массовой концентрации одной или нескольких аминокислот превышают верхнюю границу диапазона градуировочной характеристики, то необходимо разбавить раствор дистиллированной водой так, чтобы значение массовой концентрации в полученном растворе находилось в середине диапазона измеряемых значений.

8 Обработка результатов измерений

Массовую долю каждой аминокислоты в пробе X, %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_{гидр} \cdot V_{кон} \cdot C_{изм} \cdot 100}{m \cdot V_{ал} \cdot 1000}, \quad (3)$$

где $V_{гидр}$ – общий объем гидролизата, см^3 (10 см^3);

$V_{кон}$ – объем конечного (анализируемого) раствора, см^3 (0,5 см^3);

$C_{изм}$ – измеренное значение массовой концентрации аминокислоты в растворе, подготовленном по 7.4, мг/дм^3;

100 – коэффициент перевода результата в проценты;

m – масса анализируемой пробы, мг (100 мг);

$V_{ал}$ – объем аликвотной порции гидролизата, взятый для получения ФТК-производных, см^3 (0,05 см^3);

1000 – коэффициент перевода единиц измерения объема.

При соблюдении рекомендованных в разделе 7 объемов растворов массовую долю каждой аминокислоты в пробе X, %, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_{изм} \cdot 10}{m}, \quad (4)$$

где $C_{изм}$ – измеренное значение массовой концентрации аминокислоты в растворе, подготовленном по 7.4, мг/дм^3;

m – масса анализируемой пробы, мг (100 мг);

10 – коэффициент пересчета.

Результат измерений массовой доли аминокислоты в пробе, вычисленный по формулам (3) или (4), представляют в виде ($X \pm \Delta$), %, где Δ – граница абсолютной погрешности измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$, которую вычисляют по формуле

$$\Delta = 0,01 \cdot X \cdot \delta, \quad (5)$$

где 0,01 – коэффициент пересчета;

X – результат измерений массовой доли аминокислоты по формулам (3) или (4), %;

δ – граница относительной погрешности измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$, %. Значение δ приведено в таблице 3.

9 Контроль точности результатов испытаний

Расхождение между результатами двух параллельных определений X_1, %, и X_2, %, полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1 должно соответствовать условию

$$| X_1 - X_2 | \le 0,01 \cdot \overline{X} \cdot r, \quad (6)$$

где 0,01 – коэффициент пересчета;

$\overline{X}$ – среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений массовой доли аминокислоты;

r – значение предела повторяемости (см. таблицу 3), %.

Т а б л и ц а 3 – Значения показателей повторяемости, воспроизводимости и точности

В процентах

Наименование аминокислоты	Предел повторяемости, r	Предел воспроизводимости, R	Граница относительной погрешности (P = 0,95), $\pm\delta$
Аланин	25	36	26
Аргинин	31	56	40
Аспарагиновая кислота и аспарагин	28		
Валин	31		
Гистидин	45	70	50
Глицин	22	48	34
Глутаминовая кислота и глутамин	28	56	40
Лейцин и изолейцин	22	36	26
Лизин		48	34
Метионин	31		
Пролин	22	36	26
Серин	28		
Тирозин		42	30
Треонин		56	40
Фенилаланин	25	42	30
Цистин	42	70	50

Если это условие не соблюдается, то испытание повторяют на удвоенном количестве проб. При повторном неудовлетворительном результате находят и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

Расхождение между результатами испытаний, полученными в двух лабораториях, $X_{1лаб}$, %, и, $X_{2лаб}$, %, на идентичных пробах разными операторами с использованием различных экземпляров оборудования должно соответствовать условию:

$$\left| X_{1лаб} - X_{2лаб} \right| \le 0{,}01 \cdot \overline{X}_{лаб} \cdot R, \qquad (7)$$

где 0,01 – коэффициент пересчета;

$\overline{X}_{лаб}$ – среднеарифметическое значение результатов испытаний в двух лабораториях $X_{1лаб}$ и $X_{2лаб}$, %;

R – предел воспроизводимости (см. таблицу 3), %.

При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений, 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 Р ИСО 5725-6, раздел 5.

Приложение А

Примеры электрофореграмм градуировочных растворов и подготовленных проб (справочное)

А.1 Примеры электрофореграмм градуировочных растворов и подготовленных проб по схеме испытаний 1

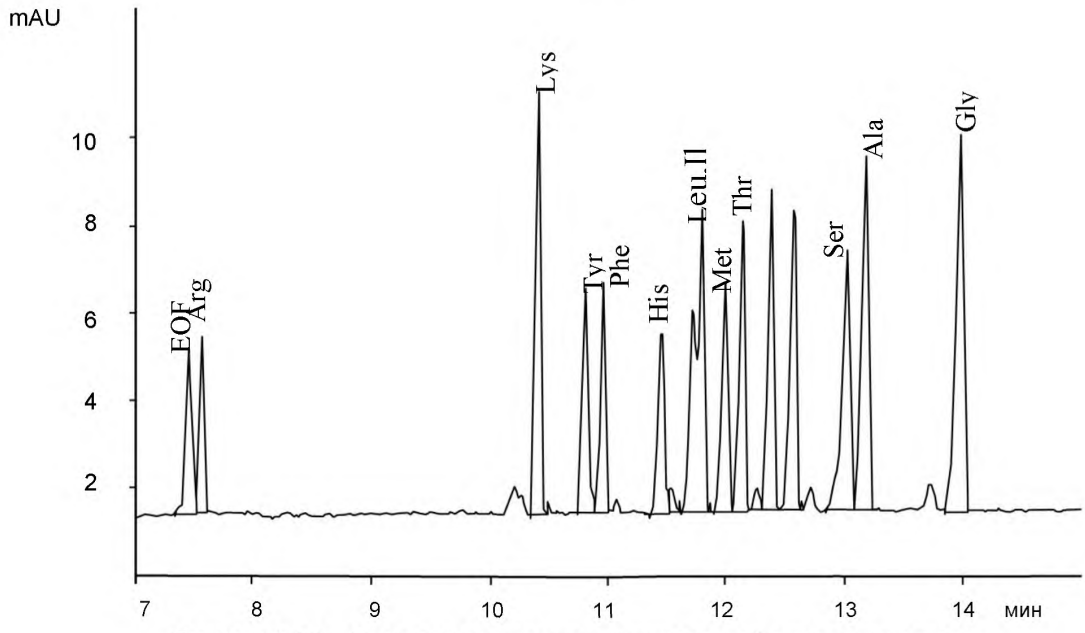


Рисунок А.1.1 – Электрофореграмма градуировочной смеси аминокислот

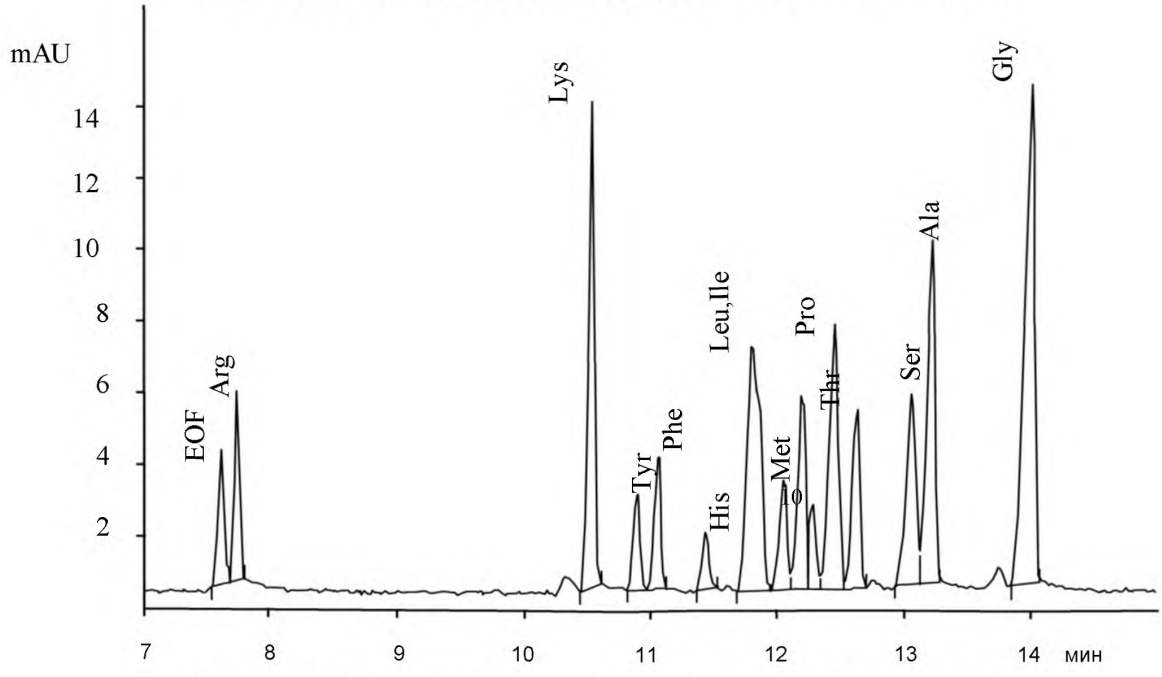


Рисунок А.1.2 – Электрофореграмма подготовленной пробы рыбной муки

А.2 Примеры электрофореграмм градуировочных растворов и подготовленных проб по схеме испытаний 2

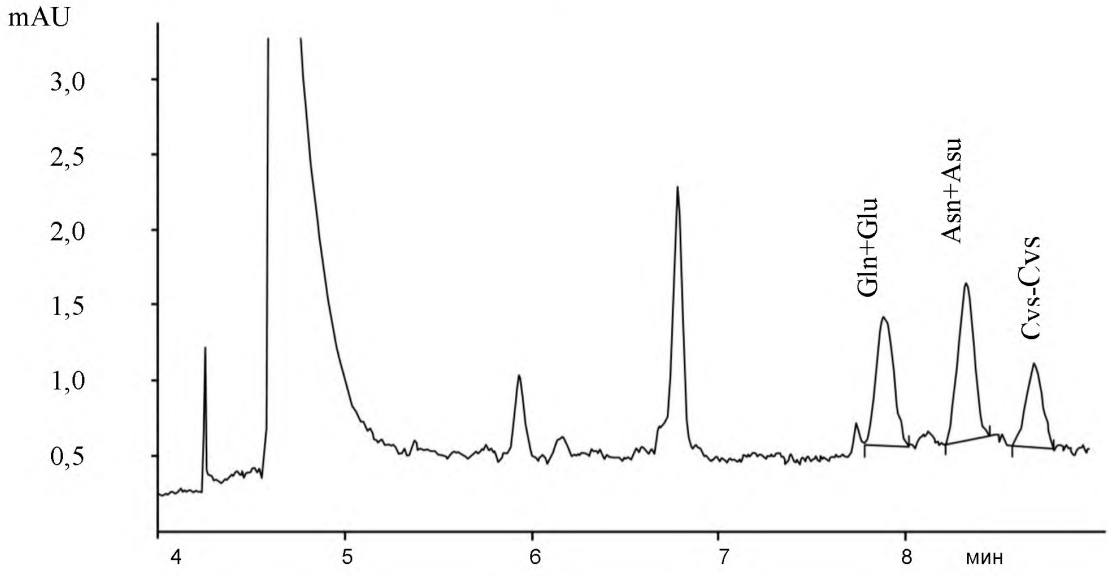


Рисунок А.2.1 – Электрофореграмма градуировочной смеси аминокислот

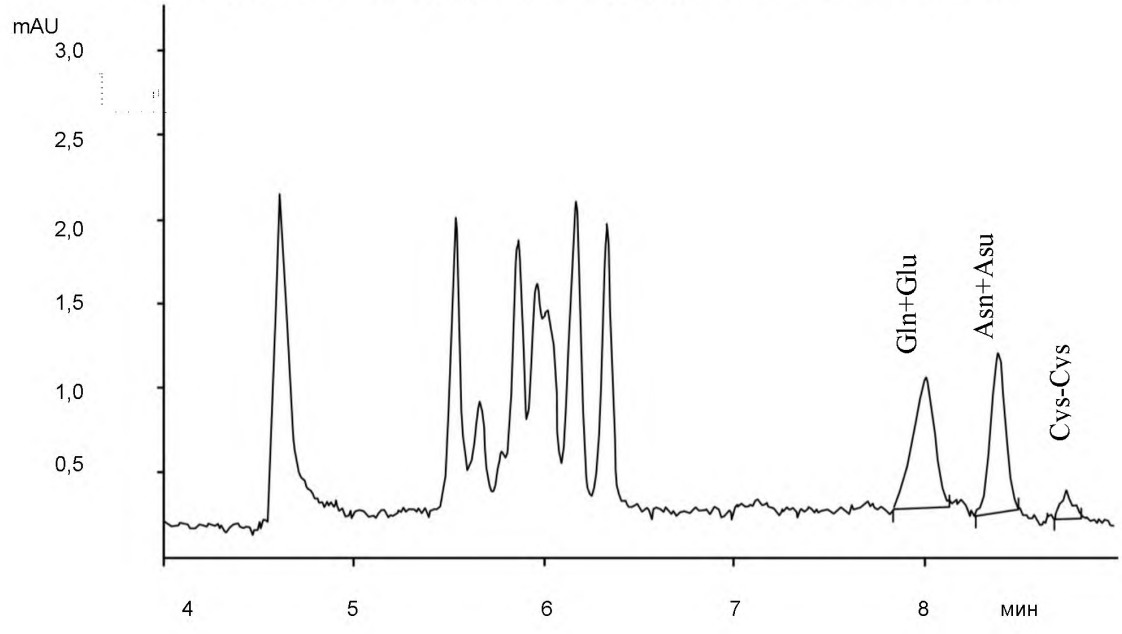


Рисунок А.2.2 – Электрофореграмма подготовленной пробы рыбной муки

УДК 636.085.3:006.354 ОКС 65.120 С19

Ключевые слова: корм, комбикорм, сырье, протеиногенные аминокислоты, аргинин, лизин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лейцин, изолейцин, метионин, валин, пролин, треонин, серин, аланин, цистин, глутамин, глутаминовая кислота, аспарагин, аспарагиновая кислота, гидролиз, ФТК-производные, капиллярный электрофорез, электрофореграмма

Подписано в печать 01.09.2014. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 2,33. Тираж 41 экз. Зак. 3950

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru