

СОВЕТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ВЗАИМОПОМОЩИ

СТАНДАРТ СЭВ
СТ СЭВ 4156—83

СРЕДСТВА МОЮЩИЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ЭНЗИМОСОДЕРЖАЩИЕ

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Цена 3 коп.

1986

gost.e-ecolog.ru

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 24 апреля 1984 г. № 1400 стандарт Совета Экономической Взаимопомощи СТ СЭВ 4156—83 «Средства моющие синтетические энзимосодержащие. Метод определения протеолитической активности» введен в действие непосредственно в качестве государственного стандарта СССР

в договорно-правовых отношениях по сотрудничеству

с 01.07.85

УДК 648.18.001.4

Настоящий стандарт СЭВ является обязательным в рамках Конвенции о применении стандартов СЭВ

СОВЕТ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ВЗАИМОПОМОЩИ	СТАНДАРТ СЭВ	СТ СЭВ 4156—83
	СРЕДСТВА МОЮЩИЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ЭНЗИМОСОДЕРЖАЩИЕ Метод определения протеолитической активности	Группа У29

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1. Для испытания применяют реактивы квалификации х. ч. или ч. д. а. и дистиллированную воду или воду такой же чистоты.

1.2. Все указанные реактивы взвешивают с погрешностью не более 0,01 g.

2. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод заключается в гидролизе белкового субстрата (казеина) при pH 10,5 и температуре 40°C и колориметрическом определении содержания образовавшегося в гидролизате тиразина с реактивом Фолина.

3. АППАРАТУРА И МАТЕРИАЛЫ

3.1. Ультратермостат, обеспечивающий температуру нагрева (40±0,1)°C.

3.2. pH-метр.

3.3. Мешалка магнитная.

3.4. Фотоэлектроколориметр.

3.5. Воронки стеклянные диаметром от 5 до 7 mm.

3.6. Баня водяная.

3.7. Пробирки стеклянные диаметром от 15 до 19 mm, высотой от 150 до 180 mm.

3.8. Бумага индикаторная (калийно-йодистая).

4. РЕАКТИВЫ И РАСТВОРЫ

4.1. Казеин по Гаммерстену.

4.2. Натрия гидроокись, раствор концентрации c (NaOH) = = 1 mol/dm³ (1 н.), готовят по СТ СЭВ 3674—82.

Утвержден Постоянной Комиссией по сотрудничеству в области стандартизации
Прага, июль 1983 г.

4.3. Натрий вольфрамовокислый ($Na_2WoO_4 \cdot 2H_2O$).

4.4. Натрий молибденовокислый ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$).

4.5. Кислота фосфорная орто, плотность, 1,698 g/cm³.

4.6. Кислота соляная концентрированная.

4.7. Литий сернокислый (Li_2SO_4).

4.8. Бром.

4.9. Натрий двууглекислый, раствор c ($NaHCO_3$) = 0,2 mol/dm³; готовят следующим образом: взвешивают 16,8 g двууглекислого натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 cm³ и доводят водой до метки.

4.10. Натрий углекислый, раствор c (Na_2CO_3) = 0,2 mol/md³; готовят следующим образом: взвешивают 21,2 g безводного углекислого натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 cm³ и доводят водой до метки.

4.11. Раствор буферный; готовят следующим образом: в мерную колбу вместимостью 200 cm³ помещают 45 cm³ раствора углекислого натрия, 5 cm³ раствора двууглекислого натрия, наливают 150 cm³ воды и перемешивают.

4.12. Казеин, 1%-ный раствор (субстрат); готовят следующим образом: взвешивают 2 g казеина по Гаммерстену с погрешностью не более 0,0001 g, переносят в коническую колбу вместимостью 300 cm³ и приливают 140 cm³ буферного раствора pH = 10,7. Колбу ставят на магнитную мешалку и раствор перемешивают в течение 30 min. Затем, продолжая перемешивать раствор, колбу с казеином помещают в водяную баню при 70°C для полного растворения и нагревают раствор до 40°C и при этой температуре доводят pH до 10,5 добавлением раствора гидроокиси натрия. После этого раствор казеина переводят из конической колбы в мерную колбу вместимостью 200 cm³ и доводят объем буферным раствором до 180—190 cm³. Далее раствор казеина охлаждают проточной водой до 20°C и объем его доводят до 200 cm³ буферным раствором. Срок хранения приготовленного раствора казеина в холодильнике не более 2 d.

4.13. Раствор Фолина основной; готовят следующим образом: в колбу вместимостью 1500 cm³ наливают 700 cm³ воды, добавляют 100 g вольфрамовокислого натрия и 25 g молибденовокислого натрия. Затем приливают 50 см³ ортофосфорной кислоты и 100 cm³ концентрированной соляной кислоты. Раствор кипятят в течение 10 h с обратным холодильником. Далее раствор охлаждают и в охлажденный раствор добавляют 150 g сернокислого лития, 50 cm³ воды и 4—5 капель брома. После этого раствор снова кипятят с обратным холодильником, чтобы удалить избыток брома (проверка индикаторной бумагой). Раствор должен иметь желтую окраску. Если цвет раствора зеленый, то обработку бромом надо повторить.

После того, как раствор остынет, добавляют воду до объема 1000 cm^3 и фильтруют через фильтровальную бумагу. Раствор хранят в темной склянке в холодильнике. Через 2—3 мес хранения в раствор добавляют 1—2 капли брома и снова кипятят. Срок годности основного раствора Фолина не более года. Показателем непригодности раствора является его помутнение и изменение окраски на зеленую. Рабочий раствор готовят перед проведением испытания из основного путем разбавления его водой в соотношении 1+3.

4.14. Кислота трихлоруксусная, раствор c (CCl_3COOH) = =0,3 mol/dm^3; готовят следующим образом: взвешивают 49,05 g трихлоруксусной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 cm^3 и доводят объем водой до метки.

4.15. Натрий углекислый, раствор c (Na_2CO_3) = 0,5 mol/dm^3; готовят следующим образом: взвешивают 53 g углекислого натрия, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 cm^3 и доводят объем водой до метки.

5. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

Приготовление раствора испытуемого моющего средства.

Взвешивают 10 g испытуемого моющего средства, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 cm^3 и доводят объем водой до метки. Из полученного раствора берут 25 cm^3, помещают в мерную колбу вместимостью 100 cm^3 и доводят объем раствора водой до метки. Разведение повторяют до тех пор, пока в последнем разведении количество препарата щелочной протеазы в 2 cm^3 реакционной смеси не превысит 0,75—1,0 mg.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ

В первую пробирку (контрольную) наливают 5 cm^3 раствора казеина и выдерживают в ультратермостате при 40°С в течение 5 min. В эту пробирку добавляют 2,5 cm^3 воды, перемешивают и опять помещают в ультратермостат, где выдерживают при 40°С в течение 60 min. Затем берут пробирки в количестве, соответствующем количеству разведений основного раствора, и в каждую из них наливают по 5 cm^3 раствора казеина, причем каждое разведение анализируют в двух повторностях. Пробирки выдерживают в ультратермостате при 40°С в течение 5 min, добавляют в каждую из них по 2,5 cm^3 испытуемого раствора, перемешивают и выдерживают в ультратермостате при 40°С в течение 60 min.

По окончании гидролиза в каждую из пробирок, начиная с контрольной, добавляют по 5 cm^3 раствора трихлоруксусной кислоты, чтобы прервать реакцию и осадить непрогидролизированный ка-

зеин. Смесь быстро перемешивают и выдерживают в ультратермостате при 40°С в течение 15 min для полного осаждения. Затем раствор фильтруют через фильтровальную бумагу и в фильтрате определяют количество прогидролизованного белка по содержанию образовавшегося тиразина. Для этого наливают по 2 cm^3 фильтрата в пробирки и медленно прибавляют в каждую пробирку по 5 cm^3 раствора углекислого натрия концентрации c (Na_2CO_3) =0,5 mol/dm^3 и по 1 cm^3 рабочего раствора Фолина. Полученный раствор выдерживают в ультратермостате при 40°С в течение 30 min до появления синей окраски. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность испытуемых растворов по отношению к контрольной пробе на фотоэлектроколориметре при длине волны 656—677 nm в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 5 mm

7. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЯ

7.1. Протеолитическую активность (X) в единицах ФОЛП на 1 g моющего средства вычисляют по формуле

$$X=\frac{(4{,}7\cdot D+0{,}1)\ 1000}{m},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора;

m — содержание энзима в 2 cm^3 фильтрата, mg;

4,7 и 0,1 — постоянные коэффициенты, полученные экспериментально;

1000 — переводной коэффициент mg в g.

7.2. Относительная погрешность определения не превышает ±5%.

7.3. За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое значение результатов, полученных при испытании двух параллельных проб испытуемого моющего средства.

Конец

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

За единицу протеолитической активности принимают такое количество энзима, которое катализирует гидролиз 1 g белка (казеина) при расщеплении его на 30% в принятых условиях (температура 40°С, pH=10,5, продолжительность гидролиза 60 min).

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Автор — делегация ВНР в Постоянной Комиссии по сотрудничеству в области химической промышленности
2. Тема — 14.550.20—80.
3. Стандарт СЭВ утвержден на 53-м заседании ПКС.
4. Сроки начала применения стандарта СЭВ:

Страны—члены СЭВ	Сроки начала применения стандарта СЭВ	
	в договорно-правовых отношениях по экономическому и научно-техническому сотрудничеству	в народном хозяйстве
НРБ		
ВНР	Июль 1985 г.	
СРВ		
ГДР	—	—
Республика Куба		
МНР		
ПНР	Июль 1985 г.	—
СРР	—	—
СССР	Июль 1985 г.	—
ЧССР	—	—

5. Срок первой проверки — 1990 г., периодичность проверки — 5 лет.

Сдано в наб 26 02 86 Подп в печ. 13 03 86 0,5 усл. п. л 0,5 усл. кр.-отт. 0,35 уч.-изд. л
Тир 4 000 Цена 3 коп.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123840, Москва, ГСП, Новопресненский пер., 3
Гип «Московский печатник» Москва, Лялин пер., 6 Зак 1892

gost.e-ecolog.ru