ГОСТ 13496.21—87

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИЗИНА И ТРИПТОФАНА

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

УДК 636.085.3:006.354 Группа С19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Методы определения лизина и триптофана

ГОСТ 13496.21—87

Feeds, mixed feeds and raw material.
Methods for determining content of lisin and tryptophane

МКС 65.120
ОКСТУ 9209

Дата введения 01.07.88

Настоящий стандарт распространяется на все виды кормов, комбикорма и комбикормовое сырье и устанавливает хроматографические и колориметрический методы определения в них аминокислот лизина и триптофана.

Стандарт предназначается для научно-исследовательских учреждений, лабораторий агрохимической службы, республиканских и зональных лабораторий комбикормовой промышленности.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Отбор проб — по ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 17681.

2. МЕТОД ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (НА АВТОАНАЛИЗАТОРЕ АМИНОКИСЛОТ)

2.1. Сущность метода заключается в расщеплении пептидных связей белка соляной кислотой или щелочью при нагревании и избирательной сорбции аминокислот на ионообменнике жидкостной хроматографической колонки. При реакции с нингидриновым реактивом образуется окрашенный комплекс, интенсивность которого пропорциональна содержанию аминокислоты в растворе.

2.2. **Средства испытаний**

Для проведения испытания применяют:

измельчитель проб растений ИПР-2;

сушилку проб кормов СК-1 или шкаф сушильный лабораторный, обеспечивающий погрешность поддержания температуры не более 5 °С;

мельницу лабораторную марки МРП-2;

сито с отверстиями 1 × 1 мм или диаметром 1 мм;

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с пределом взвешивания 200 и 500 г по ГОСТ 24104*;

автоклав по ГОСТ 14106;

шкаф сушильный типа СЭШ-3М или аналогичный с рабочей температурой 110 °С, максимальным перепадом температур 2 °С и периодическим колебанием температур в рабочей зоне ±0,5 °С;

аминокислотный анализатор;

устройство для выпаривания гидролизатов УВГ-1;

холодильник бытовой;

pH-метр 340;

дозатор стеклянный вместимостью 10 см^3;

газовую горелку однопламенную универсальную по ГОСТ 1077;

баллон с газом пропан-бутан;

ампулы стеклянные с перетяжкой вместимостью 20 см^3 по ГОСТ 21400;

* С 1 июля 2002 г. введен в действие ГОСТ 24104—2001. На территории Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228—2008 (здесь и далее).

Издание официальное **Перепечатка воспрещена**

© Издательство стандартов, 1987
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2011

колбы мерные исполнений 1 и 2 вместимостью 50, 100, 1000 см^3 2-го класса точности по ГОСТ 1770;

пробирки стеклянные вместимостью 20 см^3 по ГОСТ 1770;

пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5, 6 вместимостью 1, 2, 5, 10 см^3 2-го класса точности по ГОСТ 29227;

воронки стеклянные диаметром 4—6 см по ГОСТ 25336;

ступку фарфоровую;

фильтры беззольные с синей полосой диаметром 8 см по ГОСТ 12026;

набор реактивов к аминокислотному анализатору;

набор аминокислот стандартный;

кислоту соляную концентрированную по ГОСТ 3118, х. ч. и раствор соляной кислоты с концентрацией 6 моль/дм^3; готовят смешиванием равных объемов концентрированной соляной кислоты и дистиллированной воды (1:1);

спирт этиловый по ГОСТ 5962*;

бария гидроокись, 8-водную по ГОСТ 4107, х. ч.;

натрий углекислый безводный по ГОСТ 83, х. ч., раствор с массовой долей 10 %;

натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, х. ч. или ч. д. а.;

фенол;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч., раствор с массовой долей 50 %;

пропанол-2 (изопропиловый спирт);

воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

2.3. **Подготовка к испытанию**

2.3.1. Подготовка проб

Среднюю пробу сена, сенажа, соломы или зеленой массы, отобранную по ГОСТ 27262, измельчают на отрезки длиной до 1—3 см. Корнеплоды разрезают на пластинки (ломтики) толщиной до 0,8 см. Методом квартований выделяют часть средней пробы, масса которой после высушивания должна быть не менее 100 г. Высушивание проб проводят в сушильном шкафу при температуре 60—65 °С до воздушно-сухого состояния. После высушивания воздушно-сухую пробу размалывают на мельнице и просеивают через сито. Остаток на сите измельчают ножницами или в ступке, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Средние пробы комбикормов, зерна, жмыхов, шротов, гранул, травяной муки или витаминной муки из древесной зелени размалывают без предварительного подсушивания и просеивают через сито.

Подготовленные пробы хранят в стеклянной или пластмассовой банке с крышкой в сухом темном месте.

2.3.2. Приготовление растворов и реактивов

2.3.2.1. *Приготовление буферного раствора с pH 2,2*

19,6 г лимоннокислого трехзамещенного натрия растворяют в 200—300 см^3 дистиллированной воды, приливают 16,6 см^3 концентрированной соляной кислоты, 1 см^3 фенола и объем доводят до 1 дм^3 в мерной колбе дистиллированной водой. Концентрацию водородных ионов контролируют на pH-метре и при необходимости корректируют раствором гидроокиси натрия с массовой долей 50 % или концентрированной соляной кислотой.

2.3.2.2. *Приготовление нейтрализующего раствора*

10 г гидроокиси натрия растворяют в буферном растворе с pH 2,2, охлаждают и доводят объем до метки в мерной колбе вместимостью 100 см^3.

2.3.2.3. *Приготовление стандартного раствора лизина*

Навеску (156±0,1) мг монохлорида лизина растворяют в 50 см^3 соляной кислоты с концентрацией 0,1 моль/дм^3 (3,1 см^3 концентрированной соляной кислоты растворяют в 1000 см^3 дистиллированной воды). 1 см^3 такого раствора содержит 2,5 мг чистого лизина.

2.3.2.4. *Приготовление стандартного раствора триптофана*

Навеску (125±0,1) мг триптофана растворяют в водном растворе изопропанола (1:9) в мерной колбе вместимостью 50 см^3. 1 см^3 такого раствора содержит 2,5 мг триптофана.

Рабочие стандартные растворы аминокислот готовят из основных разведением в буфере с pH 2,2 для лизина и водном растворе изопропанола — для триптофана.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 51652—2000 (здесь и далее).

2.4. **Проведение испытания**

2.4.1. Подготовка гидролизатов

2.4.1.1. *Проведение кислотного гидролиза в растворе соляной кислоты концентрации 6 моль/дм^3 для определения лизина*

а) Гидролиз в термостате

Навеску воздушно-сухого корма массой (100±0,1) мг аккуратно переносят на дно ампулы с перетяжкой, добавляют 2—3 капли этилового спирта и дозатором приливают 10 см^3 раствора 6 моль/дм^3 соляной кислоты. Ампулу запаивают в пламени газовой горелки в месте перетяжки, устанавливают в штатив и помещают в предварительно нагретый до температуры 110 °С сушильный шкаф на 24 ч. После завершения гидролиза ампулы охлаждают до комнатной температуры, взбалтывают и содержимое переносят на беззольный фильтр.

2 см^3 фильтрата выпаривают досуха и осадок растворяют в 10 см^3 буферного раствора с pH 2,2 или добавляют 5 см^3 нейтрализующего раствора. Содержимое перемешивают. Гидролизат готов для нанесения на хроматографическую колонку.

б) Гидролиз в автоклаве

Навеску воздушно-сухого корма массой (100±0,1) мг аккуратно переносят на дно пробирки вместимостью 20 см^3, добавляют 2—3 капли этилового спирта и дозатором приливают 10 см^3 раствора 6 моль/дм^3 соляной кислоты. Пробирки закрывают стеклянными колпачками или воронками для предотвращения разбрызгивания кислоты во время гидролиза и помещают в автоклав. Гидролиз проводят при давлении 0,25 МПа и температуре 137 °С в течение 3 ч. После завершения гидролиза пробирки охлаждают до комнатной температуры, осторожно взбалтывают и содержимое переносят на беззольный фильтр, 2 см^3 фильтрата выпаривают досуха и приливают 10 см^3 буферного раствора с pH 2,2 или добавляют 5 см^3 нейтрализующего раствора. Содержимое перемешивают. Гидролизат готов для нанесения на хроматографическую колонку.

2.4.1.2. *Проведение гидролиза с гидроокисью бария для определения содержания триптофана*

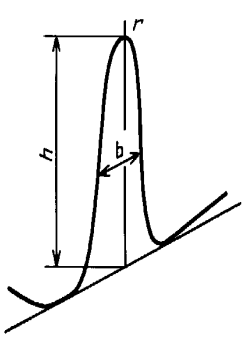
Навеску воздушно-сухого корма массой (200±0,1) мг аккуратно переносят на дно ампулы с перетяжкой, добавляют 2—3 капли этилового спирта, 1,6 г свежерастертой в фарфоровой ступке гидроокиси бария и содержимое тщательно перемешивают. Затем приливают 3,0 см^3 дистиллированной воды на каждую пробу. Ампулы запаивают в месте перетяжки в пламени газовой горелки и помещают в предварительно нагретый до температуры 110 °С сушильный шкаф на 18 ч. По окончании гидролиза ампулы тщательно встряхивают, охлаждают до комнатной температуры и помещают в холодильник на 1,5—2 ч для осаждения ионов бария.

Методом обратного фильтрования отбирают из пробирки 1 см^3 надосадочной жидкости и приливают равный объем раствора углекислого натрия с массовой долей 10 % для осаждения оставшегося бария. Пробирки с гидролизатами закрывают пробками и хранят в холодильнике.

Перед нанесением на хроматографическую колонку pH гидролизатов доводят до 2,2. Для этого берут аликвотную часть гидролизата, подкисляют ее концентрированной соляной кислотой до pH 2,2 и приливают равный аликвотной части гидролизата объем буферного раствора с pH 2,2. При расчете учитывают данный фактор разведения.

2.4.2. Проведение анализа

Гидролизаты наносят на колонку автоанализатора аминокислот. Для сравнения испытуемых гидролизатов используют рабочий стандартный раствор аминокислоты. Анализ проводят по короткой программе с использованием буферного раствора для идентификации основных аминокислот в соответствии с правилами проведения анализа на аминоанализаторах.



В результате получают хроматограммы с пиками кривых, площади которых пропорциональны концентрациям аминокислот.

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. чертеж). Площадь пика S_r в квадратных миллиметрах вычисляют по формуле

$$S_r = h \cdot b.$$

2.5. **Обработка результатов**

2.5.1. Массу аминокислоты (X) в граммах на 1 кг воздушно-сухого вещества корма вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{C \cdot S_r \cdot V \cdot 1000}{S_{ст} \cdot m},$$

где C — концентрация аминокислоты стандартного рабочего раствора, мг/см^3;

S_r — площадь пика аминокислоты исследуемой пробы, мм^2;

V — конечный объем гидролизата, см^3;

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

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

За результат испытания принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений d и между результатами, полученными в разных условиях D, при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны превышать соответственно 10 и 25 %.

Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

Предельная относительная погрешность результата анализа при односторонней доверительной вероятности $P = 0{,}95$ составляет 15 %.

2.5.2. Массу аминокислоты (X_2) в граммах на 1 кг сухого вещества корма вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{X_1 \cdot 100}{100 - W},$$

где X_1 — масса аминокислоты в испытуемой пробе, грамм на 1 кг воздушно-сухого вещества корма;

W — влажность испытуемой пробы, %.

Допускается проведение анализа без параллельных определений при наличии стандартных образцов для контроля правильности анализов и достаточной точности контрольных анализов при проведении внешнего и внутрилабораторного контроля.

В этом случае контроль сходимости параллельных определений проводят в соответствии с нормативно-техническими документами по внутрилабораторному контролю, утвержденными в установленном порядке.

3. МЕТОД ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ФИКСИРОВАННОМ СЛОЕ ИОНООБМЕННИКА

3.1. Сущность метода заключается в расщеплении пептидных связей белка соляной кислотой или щелочью при нагревании и избирательной сорбции аминокислот в тонком слое ионообменника. При реакции с нингидриновым реактивом образуется окрашенный комплекс, интенсивность которого пропорциональна содержанию аминокислоты в растворе.

3.2. **Средства испытаний**

Для проведения испытания применяют:

основной комплекс для тонкослойной хроматографии «АТХ» или ОЕ-304 фирмы «Лабор»;

денситометр БНАН-170 или экстинкционно-регистрирующий прибор с интегратором ЕРУ-65-М фирмы «Карл Цейс Йена»;

электрофен;

пульверизатор;

шкаф сушильный типа СЭШ-3М или аналогичный с рабочей температурой 110 °С, максимальным перепадом температур 2 °С и периодическим колебанием температур в рабочей зоне ±0,5 °С;

термостат воздушный с регулируемой температурой в пределах 20—70 °С;

мельницу лабораторную марки МРП-2;

холодильник бытовой;

потенциометр рН-340;

измельчитель проб растений ИПР-2;

сушилку проб кормов СК-1 или шкаф сушильный лабораторный с погрешностью поддержания температуры не более 5 °С;

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с пределом взвешивания 200 и 500 г по ГОСТ 24104;

сито с отверстиями 1 × 1 или диаметром 1 мм;

автоклав по ГОСТ 14106;

газовую горелку однопламенную универсальную по ГОСТ 1077;

микрошприц вместимостью 0,01 $см^3$;

пластинки «Фиксион 50 × 8» размером 20 × 20 см;

пробирки стеклянные вместимостью 10 $см^3$ по ГОСТ 1770;

воронки стеклянные диаметром 6 см по ГОСТ 25336;

ампулы стеклянные с перетяжкой вместимостью 10—20 $см^3$ по ГОСТ 21400;

пипетки градуированные исполнений 1, 2, 3, 4, 5, 6 вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ 2-го класса точности по ГОСТ 29227;

колбы мерные исполнений 1 и 2 вместимостью 50, 100, 1000 $см^3$ 2-го класса точности по ГОСТ 1770;

фильтры беззольные с синей полосой диаметром 8 см по ГОСТ 12026;

бумагу фильтровальную;

набор аминокислот стандартный;

ацетон по ГОСТ 2603, ч. д. а.;

нингидрин кристаллический;

фенол, ч. д. а.;

натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 22280, х. ч. или ч. д. а.;

спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;

кадмий уксуснокислый двухводный по ГОСТ 5284;

натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч., раствор с массовой долей 50 %;

бария гидроокись 8-водную по ГОСТ 4107;

натрий углекислый безводный по ГОСТ 83, х. ч., раствор с массовой долей 10 %;

натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.;

кислоту лимонную по ГОСТ 3652, х. ч.;

кислоту ледяную уксусную по ГОСТ 61;

кислоту соляную концентрированную по ГОСТ 3118, х. ч. и раствор соляной кислоты с концентрацией 6 моль/$дм^3$; готовят смешиванием разных объемов концентрированной соляной кислоты и дистиллированной воды (1:1);

пропанол-2 (изопропиловый спирт);

метилцеллозольв (монометиловый эфир этиленгликоля);

воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

3.3. **Подготовка к испытанию**

3.3.1. Подготовка проб — по п. 2.3.1.

3.3.2. Приготовление растворов и реактивов

3.3.2.1. *Приготовление буферных растворов*

Для приготовления буферных растворов используют дистиллированную воду и реактивы, указанные в табл. 1. Корректируют pH буферных растворов концентрированной соляной кислотой или раствором гидроокиси натрия с массовой долей 50 %.

Таблица 1

Реактивы	pH буферных растворов			
	2,2	3,28	3,3	6,0
Лимонная кислота, г	—	1,4	84,0	7,0
Натрий лимоннокислый, г	19,6	—	—	—
Натрия гидроокись, г	—	0,8	16,0	4,0
Хлористый натрий, 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

Растворы доводят дистиллированной водой в мерной колбе до 1 $дм^3$.

3.3.2.2. *Приготовление кадмиево-нингидринового реактива*

Раствор А: (готовят непосредственно перед употреблением). 0,5 г нингидрина растворяют в 50 $см^3$ ацетона.

Раствор В: 1,0 г уксуснокислого кадмия растворяют в смеси 50 $см^3$ ледяной уксусной кислоты и 100 $см^3$ дистиллированной воды.

Для проявления двух пластинок берут смесь из 50 $см^3$ раствора А и 10 $см^3$ раствора В.

3.3.2.3. *Приготовление стандартных растворов аминокислот*

Основные стандартные растворы лизина готовят по п. 2.3.2.3 и триптофана — по п. 2.3.2.4.

Рабочие стандартные растворы с близкими к предполагаемым концентрациям аминокислот в исследуемых пробах готовят из основных растворов разведением в буфере с pH 2,2 — для лизина и водном растворе изопропанола — для триптофана.

3.4. **Проведение испытания**

3.4.1. Подготовка гидролизатов

3.4.1.1. *Проведение кислотного гидролиза в растворе соляной кислоты с концентрацией 6 моль/$дм^3$ для определения лизина*

а) Гидролиз в термостате

Навеску воздушно-сухого корма массой (100±0,1 мг) аккуратно переносят на дно ампулы с перетяжкой, добавляют 2—3 капли этилового спирта и дозатором приливают 10 $см^3$ раствора 6 моль/$дм^3$ соляной кислоты. Ампулу запаивают в пламени газовой горелки в месте перетяжки, устанавливают в штатив и помещают в предварительно нагретый до температуры 110 °С сушильный шкаф на 24 ч. После завершения гидролиза ампулы охлаждают до комнатной температуры, содержимое осторожно взбалтывают и переносят на беззольный фильтр.

При наличии стеклянных микропипеток гидролизат используют для нанесения на хроматографическую пластинку.

При отсутствии стеклянных микропипеток гидролизат количественно переносят на беззольный фильтр. Фильтрат выпаривают досуха и растворяют в 5 $см^3$ буферного раствора с pH 2,2.

б) Гидролиз в автоклаве

Навеску воздушно-сухого корма массой (100±0,1) мг аккуратно переносят на дно пробирки вместимостью 20 $см^3$, добавляют 2—3 капли этилового спирта и дозатором приливают 10 $см^3$ раствора 6 моль/$дм^3$ соляной кислоты. Пробирки закрывают стеклянными колпачками или воронками для предотвращения разбрызгивания кислоты при нагревании и помещают в автоклав. Гидролиз проводят при давлении 0,25 МПа и температуре 137 °С в течение 3 ч. После завершения гидролиза пробирки охлаждают до комнатной температуры, осторожно взбалтывают и переносят содержимое на беззольный фильтр.

При наличии стеклянных микропипеток гидролизат используют для нанесения на хроматографическую пластинку.

При отсутствии стеклянных микропипеток гидролизат количественно переносят на беззольный фильтр. Фильтрат выпаривают досуха и растворяют в 5 $см^3$ буферного раствора с pH 2,2.

3.4.1.2. Проведение гидролиза с гидроокисью бария для определения содержания триптофана — по п. 2.4.1.2 и операцию гидролиза заканчивают на стадии добавления равного объема раствора углекислого натрия.

3.4.2. Подготовка к хроматографированию

3.4.2.1. *Уравновешивание пластинок «Фиксион 50× 8»*

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 (3—5 шт.) помещают в камеру для хроматографирования, куда предварительно наливают буферный раствор с pH 3,28 слоем 1—1,5 см. Нижний край пластинок должен быть погружен в раствор на 1 см. Пластинки выдерживают в закрытой камере в течение суток при комнатной температуре, затем снимают фильтровальную бумагу и высушивают на воздухе. Пластинки хранят в темном месте не более 1 мес.

3.4.2.2. *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 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.

3.4.2.3. *Подготовка камеры для хроматографии*

Для определения лизина камеру предварительно насыщают буферным раствором с pH 3,3, для триптофана — с pH 6,0. Стенки камеры выстилают одним слоем фильтровальной бумаги и на дно наливают растворитель слоем 1,5 см. Герметично закрытую камеру помещают в термостат с температурой хроматографирования соответствующей аминокислоты на 15—20 мин до полного пропитывания бумаги.

3.4.2.4. *Подготовка микрошприца*

Из микрошприца удаляют шток, а 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.

3.4.2.5. *Нанесение растворов на пластинки*

Гидролизаты и стандартные рабочие растворы аминокислот наносят на полоски хроматографической пластинки в токе теплого воздуха электрофена. Нанесенный на полоску раствор высушивают феном. Операцию нанесения и высушивания раствора повторяют до тех пор, пока не будет нанесена вся микродоза. Для проб с содержанием лизина до 10 г на 1 кг и триптофана до 2 г на 1 кг наносят 0,01 $см^3$ гидролизата, для проб с большим содержанием аминокислот — 0,005 $см^3$. В таких же объемах наносят и стандартные рабочие растворы аминокислот. На одну пластинку наносят гидролизат 4 проб в двух повторностях и три стандартных рабочих раствора аминокислот с концентрациями, близкими по содержанию их в испытываемых пробах.

3.4.3. Хроматографирование

3.4.3.1. *Условия хроматографирования 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 верхний конец покрывал ионообменный слой шириной 1 см, а свободный загибают на противоположную сторону стекла. На 1-сантиметровый край бумаги накладывают полоску плексигласа и закрепляют резиновым кольцом. Затем пластинку помещают в предварительно нагретую до температуры 60 °С камеру так, чтобы нижний край был погружен в буферный раствор с pH 3,3 на 1 см. Камеру герметично закрывают и помещают в термостат. Хроматографирование проводят при температуре 60 °С в течение 5 ч.

3.4.3.2. *Условия хроматографирования для триптофана*

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

3.4.4. Проявление хроматограммы

По окончании хроматографирования пластинки вынимают из камеры и высушивают при комнатной температуре в вытяжном шкафу. Кадмиево-нингидриновый реактив (смесь растворов А и В) распыляют пульверизатором по всей поверхности пластинки 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.

3.4.5. Денситометрирование

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

Площадь пика определяют по п. 2.4.2.

Массовую концентрацию аминокислоты в гидролизате пробы определяют по градуировочному графику.

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

3.5. **Обработка результатов**

3.5.1. Массу аминокислоты (X_3) в граммах на 1 кг воздушно-сухого корма вычисляют по формуле

$$X_3 = \frac{C_1 \cdot V \cdot 1000}{m_1},$$

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

V — конечный объем гидролизата, см^3;

m_1 — масса навески пробы, взятая на гидролиз, мг.

Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

За результат испытания принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений d и между результатами, полученными в разных условиях D, при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны превышать соответственно 20 и 30 %. Предельная относительная погрешность результата анализа при односторонней доверительной вероятности $P = 0{,}95$ составляет 18 %.

3.5.2. Массу аминокислоты (X_4) в граммах на 1 кг сухого вещества корма вычисляют по формуле

$$X_4 = \frac{X_3 \cdot 100}{100 - W},$$

где X_3 — масса аминокислоты в испытуемой пробе, в граммах на 1 кг воздушно-сухого вещества корма;

W — влажность испытуемой пробы, %.

4. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ТРИПТОФАНА С ПАРАДИМЕТИЛАМИНОБЕНЗАЛЬДЕГИДОМ (ДМАБ)

4.1. Сущность метода заключается в расщеплении пептидных связей белка в щелочном растворе гидроокиси бария при нагревании и последующем окрашивании освобожденного индольного кольца триптофана парадиметиламинобензальдегидом. В сильно кислой среде в присутствии нитрита натрия образуется голубая окраска, интенсивность которой измеряется на фотоэлектроколориметре.

4.2. **Средства испытаний**

Для проведения испытания применяют:

шкаф сушильный типа СЭШ-3М с рабочей температурой (110±2) °С;

термостат воздушный с регулируемой температурой в пределах 20—70 °С;

сушилку проб кормов СК-1 или шкаф сушильный лабораторный с погрешностью поддержания температуры не более 5 °С;

мельницу лабораторную МРП-2;

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с пределом взвешивания 200 и 500 г по ГОСТ 24104;

холодильник бытовой;

фотоэлектроколориметр с длиной волны 650 нм (красный светофильтр), кюветой 5 мм;

центрифугу с частотой вращения 3000 мин$^{-1}$;

сито с отверстиями 1 × 1 мм или диаметром 1 мм;

насос водоструйный;

колбы мерные исполнений 1 и 2 вместимостью 50, 100, 1000 см^3 2-го класса точности по ГОСТ 1770;

пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5, 6 вместимостью 1 и 2 см^3 2-го класса точности по ГОСТ 29227;

пробирки тефлоновые с довинчивающимися крышками вместимостью 5 см^3;

пенициллиновые флаконы;

колбу Бунзена по ГОСТ 25336;

воронку Бюхнера диаметром 8—10 см по ГОСТ 9147;
бумагу фильтровальную;
казеин по Гаммерстену;
триптофан;
спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;
бария гидроокись по ГОСТ 4107;
п-диметиламинобензальдегид (ДМАБ), раствор с массовой долей 0,5 %;
кислоту соляную концентрированную по ГОСТ 3118, х. ч.;
нитрит натрия раствор с массовой долей 0,2 % по ГОСТ 4197, х. ч.;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

4.3. **Подготовка к испытанию**

4.3.1. Подготовка проб — по п. 2.3.1.

4.3.2. Приготовление растворов и реактивов

4.3.2.1. *Приготовление раствора нитрита натрия*

(0,20±0,01) г нитрита натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе до 100 см^3 (готовят в день проведения анализа).

4.3.2.2. *Приготовление раствора ДМАБ*

(70,0±1,0) г ДМАБ растворяют в 100 см^3 теплого 96 %-ного этилового спирта, охлаждают в ледяной бане, отсасывают выпавшие кристаллы на воронке Бюхнера и высушивают при комнатной температуре между листьями фильтровальной бумаги. Операцию повторяют. Высушенные кристаллы хранят в посуде из темного стекла с притертой пробкой в течение длительного времени.

(5,0±0,1) г ДМАБ растворяют в мерной колбе вместимостью 1 дм^3 концентрированной соляной кислотой. Раствор хранят в посуде из темного стекла с притертой пробкой в течение месяца.

4.3.2.3. *Приготовление основного стандартного раствора триптофана*

(100,0±0,1) мг триптофана растворяют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 100 см^3. 1 см^3 такого раствора содержит 1 мг триптофана.

4.3.2.4. *Приготовление рабочих стандартных растворов сравнения*

В мерные колбы вместимостью 50 см^3 последовательно вносят основной стандартный раствор триптофана в объемах, указанных в табл. 2. Объемы растворов доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Таблица 2

Наименование показателя	Номер колбы со стандартными растворами сравнения								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Объем основного стандартного 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 растворе сравнения в пересчете на массовую долю аминокислоты в анализируемой пробе, грамм на 1 кг воздушно-сухого корма	0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5

4.3.2.5. *Построение градуировочного графика*

Из девяти основных стандартных растворов сравнения пипеткой берут по 2 см^3 и переносят в пенициллиновые флаконы, добавляют по 5 см^3 раствора ДМАБ и перемешивают. Через 25 мин приливают по 0,2 см^3 раствора нитрита натрия, перемешивают и центрифугируют в течение 3 мин с частотой вращения 3000 мин$^{-1}$. Через 10 мин раствор фотометрируют в 5 мм кювете при длине волны 650 нм относительно первого раствора сравнения.

Строят градуировочный график, откладывая на оси абсцисс количество триптофана в граммах на 1 кг пробы, а на оси ординат — соответствующую величину оптической плотности.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднеарифметическое значение оптической плотности результатов двух отсчетов на приборе.

При стабильной работе прибора график проверяют по трем растворам сравнения в том интервале, в котором проводятся испытания. При нестабильной работе прибора растворы сравнения фотометрируют одновременно с испытуемыми растворами, каждый раз строя градуировочный график.

4.4. **Проведение испытания**

(100±0,1) мг воздушно-сухой пробы корма помещают в тефлоновую пробирку, добавляют 0,8 г свежерастертой гидроокиси бария и 1,5 $см^3$ дистиллированной воды. Пробирку герметично завинчивают крышкой и встряхивают для равномерного смачивания и перемешивания содержимого.

Пробирки устанавливают вертикально в штатив и помещают в предварительно нагретый до 110 °С термостат на 18 ч. По окончании гидролиза пробирки с растворами тщательно встряхивают, охлаждают до комнатной температуры и помещают в морозильную камеру холодильника на 20—30 мин. Охлажденные гидролизаты быстро нейтрализуют, приливая в пробирку 0,8 $см^3$ раствора с массовой концентрацией 6 моль/$дм^3$ соляной кислоты, которую также предварительно охлаждают в морозильной камере. Доводят объем растворов дистиллированной водой до 50 $см^3$. Пробирки завинчивают крышками, раствор перемешивают и в этих же пробирках центрифугируют в течение 5 мин с частотой вращения 3000 $мин^{-1}$. Пипеткой осторожно над осадком отбирают по 2,0 $см^3$ гидролизата и переносят в пенициллиновые флаконы. Добавляют по 5,0 $см^3$ раствора ДМАБ и перемешивают. Через 25 мин приливают по 0,2 $см^3$ раствора нитрита натрия, перемешивают и центрифугируют в течение 3 мин с частотой вращения 3000 $мин^{-1}$. Через 10 мин раствор фотометрируют в 5 мм кювете при длине волны 650 нм. Оптическую плотность растворов измеряют относительно первого раствора сравнения.

Для разведения гидролизатов проб с высоким содержанием триптофана используют первый раствор сравнения, приготовленный по п. 4.3.2.4.

Для определения потерь триптофана и установления коэффициента его разрушения параллельно проводят гидролиз абсолютно сухого казеина массой (0,05±0,001) г в трехкратной повторности, где вместо 2,0 $см^3$ гидролизата для окрашивания берут 1,0 $см^3$ раствора.

Коэффициент разрушения триптофана (K) при гидролизе вычисляют по формуле

$$K = \frac{17{,}0}{4 \cdot C_2},$$

где 17,0 — теоретическая масса триптофана в казеине по Гаммерстену, грамм на 1 кг абсолютно сухого вещества;

C_2 — средняя масса триптофана в пробах казеина, найденная по графику, грамм на 1 кг абсолютно сухого вещества;

4 — коэффициент пересчета.

4.5. **Обработка результатов**

4.5.1. Массу триптофана (X_5) в граммах на 1 кг воздушно-сухого корма вычисляют по формуле

$$X_5 = K \cdot C_3,$$

где K — коэффициент разрушения триптофана;

C_3 — масса триптофана в пробе, найденная по графику (с учетом разведения), грамм на 1 кг.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений d и между результатами, полученными в разных условиях D, при доверительной вероятности $P = 0{,}95$ не должны превышать следующих значений соответственно 10 и 20 %. Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака. Предельная относительная погрешность результата анализа при односторонней доверительной вероятности $P = 0{,}95$ составляет 8 %.

4.5.2. Массу триптофана (X_6) в граммах на 1 кг сухого вещества корма вычисляют по формуле

$$X_6 = \frac{X_5 \cdot 100}{100 - W},$$

где X_5 — масса триптофана в испытуемой пробе, грамм на 1 кг воздушно-сухого вещества корма;

W — влажность испытуемой пробы, %.

Допускается проведение анализа без параллельных определений при наличии стандартных образцов для контроля правильности анализов и достаточной точности контрольных анализов при проведении внешнего и внутрилабораторного контроля. В этом случае контроль сходимости параллельных определений проводят в соответствии с нормативно-техническими документами по внутрилабораторному контролю, утвержденными в установленном порядке.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Госагропромом СССР**

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 27.05.87 № 1715**

3. **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

4. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер пункта, подпункта, перечисления, приложения
ГОСТ 61—75	3.2
ГОСТ 83—79	2.2, 3.2
ГОСТ 1077—79	2.2, 3.2
ГОСТ 1770—74	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 2603—79	3.2
ГОСТ 3118—77	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 3652—69	3.2
ГОСТ 4107—78	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 4197—74	4.2
ГОСТ 4233—77	3.2
ГОСТ 4328—77	2.2, 3.2
ГОСТ 5284—84	3.2
ГОСТ 5962—67	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 6709—72	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 9147—80	4.2
ГОСТ 12026—76	2.2, 3.2
ГОСТ 13496.0—80	1.1
ГОСТ 13586.3—83	1.1
ГОСТ 13979.0—86	1.1
ГОСТ 14106—80	2.2, 3.2
ГОСТ 17681—82	1.1
ГОСТ 21400—75	2.2, 3.2
ГОСТ 22280—76	2.2, 3.2
ГОСТ 24104—88	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 25336—82	2.2, 3.2, 4.2
ГОСТ 27262—87	2.3.1
ГОСТ 29227—91	2.2, 3.2, 4.2

5. **Ограничение срока действия снято по протоколу № 2—92 Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 2—93)**

6. **ПЕРЕИЗДАНИЕ. Март 2011 г.**

gost.e-ecolog.ru