ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ (ЕАСС)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION (EASC)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й

С Т А Н Д А Р Т

ГОСТ
(проект, RU, первая редакция)

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения аминокислотного состава животного белка

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия

Минск

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

20_____

ГОСТ
(проект, RU, первая редакция)

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

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

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № от)

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

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах.

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе (каталоге) «Межгосударственные стандарты», а текст этих изменений – в информационных указателях «Межгосударственные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Межгосударственные стандарты».

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

ГОСТ
(проект, RU, первая редакция)

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

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Метод определения аминокислотного состава животного белка

Meat and meat products. Determination of amino acids composition of animal protein

Дата введения –

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает хроматографический метод определения аминокислотного состава белков мяса, включая мяса птицы, субпродуктов, мясных, мясосодержащих и изготовленных из мяса птицы продуктов.

Диапазон измерений содержания аминокислот составляет от 50 до 1000 мг/кг с минимальным уровнем их содержания в растворе 0,5 мкмоль/см^3.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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

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

ГОСТ 12.1.019–79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты [1)]

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

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019–2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

ГОСТ 61–75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ 177–88 Водорода перекись. Технические условия

ГОСТ 199–78 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 1077–79 Горелки однопламенные универсальные для ацетилено-кислородной сварки, пайки и подогрева. Типы, основные параметры и размеры и общие технические требования

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

ГОСТ 2062–77 Реактивы. Кислота бромистоводородная. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ ISO 3696–2013 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля [1)]

ГОСТ 4025–95 Мясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725–2–2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений [2)]

ГОСТ ИСО 5725–6–2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике[3)]

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501–2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

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

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

ГОСТ 5848–73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 7269–79 Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести [1)]

ГОСТ 9147–80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9656–75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 9792–73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 10157–79 Аргон газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 10652–73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'- тетра-уксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия

ГОСТ 20015–88 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 20469–95 Электромясорубки бытовые. Технические условия

ГОСТ 22280–76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5,5-водный. Технические условия

ГОСТ 23042–86 Мясо и мясные продукты. Методы определения жира [2)]

ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные. Общие технические требования [3)]

ГОСТ 25011–81 Мясо и мясные продукты. Методы определения белка [4)]

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

ГОСТ 26272–98 Часы электронно-механические кварцевые наручные и карманные. Общие технические требования

[1)] В стадии пересмотра.

[2)] В стадии пересмотра.

[3)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 53228-2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

[4)] В стадии пересмотра.

ГОСТ 26678–85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 28165–89 Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования

ГОСТ 29224–91 (ИСО 386-77) Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения

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

ГОСТ 31467–2012 Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным
указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **аминокислота:** Природное соединение, входящее в состав белков и относящееся к классу органических кислот.

П р и м е ч а н и е – Перечень и систематическое международное наименование аминокислот приведены в приложении А.

3.2 **аналит:** Вещество, определяемое при анализе.

4 Требования безопасности

4.1 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

4.2 Помещение, в котором проводятся измерения, должно быть оснащено приточно-вытяжной вентиляцией. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.3 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

5 Сущность метода

Метод основан на кислотном гидролизе белка до его полного распада на составляющие аминокислоты с последующим хроматографическим анализом смеси на автоматическом жидкостном аминокислотном анализаторе для выявления состава и определения массовой доли индивидуальных аминокислот.

Количественное определение осуществляют по площади пика идентифицированных соединений относительно градуировочной зависимости, полученной при анализе градуировочных растворов известных соединений в аналогичных условиях.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Аминокислотный анализатор жидкостной, укомплектованный:

- внешним устройством для автоматического введения анализируемой пробы;
- внутренним термостатированным реактором для проведения цветной реакции аминокислот с нингидрином;
- внутренним двухканальным проточным спектрофотометрическим детектором на длину волны 440 и 570 нм;
- внутренним автоматическим устройством для введения растворенного образца с делением потоков и ловушкой пузырьков;
- набивной хроматографической колонкой с карбоксильным катионитом*;

---

* В настоящем стандарте используется колонка BTX-C (-COONa) производства Biotronic (Германия). Данная информация является рекомендуемой.

- записывающим устройством с компьютерным управлением и автоматической программой обработки хроматографических данных в соответствии с комплектацией жидкостного хроматографа.

Мясорубка механическая по ГОСТ 4025 или электрическая по ГОСТ 20469.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIMLR 76-1 специального (I) класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,001 г или весы лабораторные по ГОСТ 24104 специального класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,001 г.

Баня водяная, обеспечивающая поддержание температуры от 20 ºС до 100 ºС, с точностью ±0,5 ºС.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

Часы электронно-механические по ГОСТ 26272.

pH-метр с диапазоном измерений от 0 до 14 ед. pH с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,1 ед. pH.

Термометр по ГОСТ 29224, с диапазоном измерения температуры от 0 ºС до 150 ºС и ценой деления 1 ºС.

Горелка газовая универсальная по ГОСТ 1077;

Испаритель ротационный по ГОСТ 28165.

Банки стеклянные вместимостью 250–500 см^3.

Пипетки градуированные 1-1-1-1 или 1-2-1-1; 1-1-1-2 или 1-2-1-2; 1-1-1-5 или 1-2-1-5; 1-1-1-10 или 1-2-1-10 по ГОСТ 29227 или дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования и относительной погрешностью дозирования не более ±1 %.

Колба круглодонная К-1-250-29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Колба мерная 2-100-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Колба коническая Кн-1-250-24/29 ТС по ГОСТ 25336.

Цилиндры 1-25, 1-100, 1-500 по ГОСТ 1770.

Стакан В-1-600 ТХС по ГОСТ 25336.

Воронка В-56(75)-80 ХС по ГОСТ 25336.

Ампула стеклянная вместимостью 20 см^3 или пробирка с тефлоновой завинчивающейся крышкой по [1].

Термостат обеспечивающий поддержание температуры от 20 ºС до 150 ºС, с точностью ±0,5 ºС.

Пробирки пластиковые с крышкой типа «Эппендорф» вместимостью 1 или 2 $см^3$.

Ступка фарфоровая по ГОСТ 9147.

Фильтр мембранный из политетрафторэтилена с диаметром пор 0,45 мкм.

Флаконы – виалы хроматографические из темного стекла вместимостью 1 – 2 $см^3$.

Аргон газообразный по ГОСТ 10157.

Гелий газообразный (сжатый) высокой чистоты.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696.

Вода бидистиллированная с электропроводимостью менее 10 мк*См* или вода дистиллированная квалификации HPLC.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х.ч.

Натрия ацетат ГОСТ по 199, х.ч.

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, х.ч.

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

Кислота индолпропионовая с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Кислота тиогликолевая с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Кислота каприловая с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Соль динатриевая этилендиаминтетрауксусной кислоты (Трилон Б) по ГОСТ 10652, х.ч.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х.ч.

Кислота борная по ГОСТ 9656, х.ч.

Метанол-яд по ГОСТ 6995, х.ч.

Натрий лимоннокислый по ГОСТ 22280-76, х.ч.

Тиодигликоль (2,2'-тиодиэтанол) с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Нингидрин с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Гидридантин гидрат с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Метилцеллозольв с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Водорода перекись по ГОСТ 177, медицинская с массовой долей перекиси водорода 30 %.

Кислота бромистоводородная по ГОСТ 2062, с массовой долей бромистоводородной кислоты 47 %, ч.д.а.

Хлороформ по ГОСТ 20015, х.ч.

Кислота индолпропионовая с массовой долей основного вещества не менее 98 %, х.ч.

Кислота тиогликолевая с массовой долей основного вещества не менее 98%, х.ч.

Стандартные образцы аминокислот: глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, пролина, фенилаланина, тирозина, метионина, цистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина, серина, треонина, с содержанием основного вещества не менее 98,0 %, х.ч. или стандартный раствор* смеси указанных аминокислот молярной концентрации 2,5 мкмоль/см^3.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, вспомогательного оборудования с техническими характеристиками не хуже , а также реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб проводят по ГОСТ 7269, ГОСТ 9792, ГОСТ 31467.

---

* В настоящем стандарте используется градуировочный раствор смеси аминокислот, производства Supelco (США). Данная информация является рекомендуемой.

7.2 Пробу измельчают, дважды пропуская через мясорубку с диаметром отверстий решетки 2–4 мм, и тщательно перемешивают.

7.3 Подготовленную пробу помещают в стеклянную банку вместимостью 250–500 $см^3$, закрывают крышкой и хранят при температуре (4±2) °С до окончания испытаний.

Допускается хранить подготовленную пробу в замороженном состоянии при температуре не выше минус 18 °С не более 7 суток.

8 Подготовка к измерению

8.1 Приготовление растворов

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

В колбу или стакан вместимостью 500 $см^3$ под тягой вносят 100 $см^3$ дистиллированной воды и осторожно по каплям прибавляют равный объем (100 $см^3$) концентрированной соляной кислоты.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре в течение двух месяцев.

8.1.2 Приготовление воды для хроматографического анализа

Используют дистиллированную воду квалификации HPLC или применяют бидистиллированную воду с электропроводимостью менее 10 мк*См*, которую подвергают дополнительной фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Воду хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 1 суток.

8.1.3 Приготовление буферного раствора *А*, pH 3,3

8,2 г ацетата натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды HPLC (около 600 $см^3$). Добавляют под тягой 3,0 $см^3$ муравьиной кислоты, 15,0 $см^3$ уксусной кислоты, 100,0 $мм^3$ (мкл) каприловой кислоты и устанавливают pH раствора равным 3,3 путем добавления по каплям необходимого дополнительного количества ледяной уксусной кислоты, добавляют 75,0 $см^3$ метанола и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор фильтруют через мембранный

фильтр 0,45 мкм. Перед применением буферный раствор деаэрируют с использованием насоса ротационного испарителя путем вакуумирования при 2,0–3,5 кПа в течение 10–15 мин. Допускается использование готового буферного раствора *А*, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 6 мес.

8.1.4 Приготовление буферного раствора *Б*, pH 3,6

8,2 г ацетата натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды HPLC (около 600 $см^3$). Добавляют под тягой 3,0 $см^3$ муравьиной кислоты, 20,0 $см^3$ уксусной кислоты, 100,0 $мм^3$ (мкл) каприловой кислоты и устанавливают pH раствора равным 3,6 путем добавления по каплям необходимого дополнительного количества ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Перед применением буферный раствор деаэрируют путем вакуумирования при 2,0–3,5 кПа в течение 10–15 мин. Допускается использование готового буферного раствора *Б*, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 6 мес.

8.1.5 Приготовление буферного раствора *В*, pH 4,5

8,2 г ацетата натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды HPLC (около 600 $см^3$). Добавляют под тягой 2,0 $см^3$ муравьиной кислоты, 1,5 $см^3$ уксусной кислоты, 100,0 $мм^3$ (мкл) каприловой кислоты и устанавливают pH раствора равным 4,5 путем добавления по каплям необходимого дополнительного количества ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Перед применением буферный раствор деаэрируют путем вакуумирования при 2,0 –

3,5 кПа в течение 10–15 мин. Допускается использование готового буферного раствора *В*, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 6 мес.

8.1.6 Приготовление буферного раствора *Г*, pH 11,0

8,2 г ацетата натрия, 0,5 г динатриевой соли этилендиаминтетраацетата, 6,0 г гидроксида натрия и 2,0 г борной кислоты вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, осторожно растворяют под тягой в небольшом количестве дистиллированной воды HPLC (около 600 $см^3$). Добавляют 1,2 $см^3$ муравьиной кислоты, 5,0 $см^3$ уксусной кислоты, 100,0 $мм^3$ (мкл) каприловой кислоты, устанавливают pH раствора равным 11,0 путем добавления по каплям необходимого дополнительного количества ледяной уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Перед применением буферный раствор деаэрируют путем вакуумирования при 2,0–3,5 кПа в течение 10–15 мин. Допускается использование готового буферного раствора *Г*, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 6 мес.

8.1.7 Приготовление буферного раствора *Е*, pH 11,0

12,0 г гидроксида натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, осторожно под тягой растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды HPLC (около 600 $см^3$). Добавляют 100,0 $мм^3$ (мкл) каприловой кислоты, устанавливают pH раствора равным 11,0 путем добавления по каплям необходимого дополнительного количества каприловой кислоты и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Перед применением буферный раствор деаэрируют путем вакуумирования при 2,0–3,5 кПа в течение 10–15 мин. Допускается использование готового буферного раствора *Е*, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 6 мес.

8.1.8 Приготовление раствора *Ж* для автоматического аминокислотного анализатора

200,0 $см^3$ метанола вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой HPLC. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Перед применением буферный раствор деаэрируют путем вакуумирования при 2,0–3,5 кПа в течение 10–15 мин. Допускается использование готового раствора *Ж*, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 1 года.

8.1.9 Приготовление буферного раствора для растворения проб, pH 2,2

9,8 г цитрата натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды HPLC (около 600 $см^3$), осторожно под тягой добавляют 8,3 $см^3$ концентрированной соляной кислоты, 1,0 $см^3$ тиодигликоля, 50,0 $мм^3$ (мкл) каприловой кислоты, устанавливают pH раствора равным 2,2 путем добавления по каплям необходимого дополнительного количества соляной кислоты и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Допускается использование готового буферного раствора для растворения проб pH 2,2, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде при комнатной температуре не более 6 мес.

8.1.10 Приготовление ацетатного буферного раствора, pH 4,8

2 г гидроксида натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, осторожно под тягой растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды HPLC (около 600 $см^3$), добавляют 14,0 $см^3$ ледяной уксусной кислоты, устанавливают pH раствора равным 4,8 путем добавления по каплям необходимого дополнительного количества уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр

0,45 мкм. Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде в холодильнике при температуре 4 ºС не более 6 мес.

8.1.11 Приготовление нингидринового раствора *З* для фотометрической идентификации аминокислот в автоматическом аминокислотном анализаторе

15,0 г нингидрина, 0,55 г гидридантин гидрата, 10 см^3 метилцеллозольва вносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, добавляют 100 см^3 метанола перемешивают в колбе до полного растворения и доводят объем раствора до метки ацетатным буферным раствором с pH 4,8. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Перед применением буферный раствор деаэрируют путем вакуумирования при 2–3,5 кПа в течение 10–15 мин. Допускается использование готового нингидринового раствора *З*, поставляемого в комплекте с аминокислотным анализатором.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде в холодильнике при температуре 4 ºС не более 2 мес.

8.1.12 Приготовление надмуравьиной кислоты для окисления серосодержащих аминокислот

В мерной колбе вместимостью 100 см^3 смешивают 10 см^3 30 %-ного пероксида водорода с 90 см^3 муравьиной кислоты. Смесь охлаждают до температуры 4 ºС и выдерживают в холодильнике в течение 45 мин (для проведения реакции).

Раствор готовят непосредственно перед проведением анализа.

8.1.13 Приготовление градуировочного раствора смеси аминокислот

Применяют готовый раствор, содержащий 2,5 мкмоль каждой аминокислоты в 1 см^3 раствора или готовят градуировочный раствор аминокислот. Для этого в мерной колбе вместимостью 1000 см^3 в небольшом количестве (около 600 см^3) буферного раствора pH 2,2 растворяют 0,19 г глицина, 0,22 г аланина, 0,29 г валина, 0,33 г лейцина, 0,33 г изолейцина, 0,29 г пролина, 0,41 г фенилаланина, 0,45 г тирозина, 0,37 г метионина, 0,31 г цистеина, 0,33 г аспарагиновой кислоты, 0,37 г глутаминовой кислоты, 0,37 г лизина, 0,44 г аргинина, 0,39 г гистидина, 0,26 г серина и 0,3 г треонина и доводят объем раствора до метки этим же буферным

раствором. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм. Перед применением раствор деаэрируют путем вакуумирования при 2,0–3,5 кПа в течение 10–15 мин.

Раствор хранят в герметично укупоренном сосуде в холодильнике при температуре 4 ºС не более 2 мес.

Примечание – При использовании смеси аминокислот целесообразно для последующей хроматографической идентификации использовать стандартные растворы различной концентрации. Величина оптимальной концентрации для достаточного сигнала регистрации на экране устанавливается экспериментально для конкретного типа хроматографа. Хорошая идентификация пиков на фотометрическом детекторе аминокислотного анализатора наблюдается при получении выходного сигнала более 50 мВ с общей интенсивностью сигнала до 1000 мВ.

8.2 Гидролиз белков и приготовление раствора пробы

8.2.1 Для снижения влияния на результат анализа липидных примесей, пробу продукта подвергают обезжириванию хлороформом в аппарате Сокслета по ГОСТ 23042. Обезжиренную пробу измельчают, растирая в ступке до получения однородного порошка.

8.2.2 Обезжиренную пробу массой 0,05 г помещают в ампулу вместимостью 20 $см^3$, заливают 5 $см^3$ раствора соляной кислоты молярной концентрации 6 моль/$дм^3$, троекратно вакуумируют содержимое ампулы под вакуумом до начала закипания содержимого раствора и заполняют верхнюю внутреннюю часть ампулы аргоном, таким образом, чтобы максимально заместить воздушный слой над раствором на аргон. Наличие остатков кислорода способствует разрушению при гидролизе серосодержащих и некоторых других аминокислот, для стабилизации которых дополнительно вносят в пробу гидролизата несколько кристалликов индолпропионовой или тиогликолевой кислоты*.

Ампулу герметично запаивают на горелке. Допускается проводить гидролиз в герметично укупориваемой пробирке с тефлоновой завинчивающейся крышкой, удерживающей давление паров соляной кислоты, и боковым отводом в соответствии с [1].

---

* Указанные вещества вносят при необходимости проведения точного количественного содержания метионина и цистеина.

Ампулу или укупоренную пробирку помещают в термостат и выдерживают смесь в течение 24 ч при температуре 110 ºС.

8.2.3 Для удаления избытка соляной кислоты гидролизат количественно переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3, упаривают досуха на роторном испарителе, добавляют 20 см^3 дистиллированной воды и упаривают под вакуумом при 2,0–3,5 кПа досуха для удаления избытка соляной кислоты при температуре 60 ºС. Операцию повторяют трижды.

Освобожденный от соляной кислоты гидролизат растворяют в 5 см^3 буферного раствора pH 2,2.

0,5 см^3 раствора пробы переносят в виалу для помещения в штатив автоматического устройства введения анализируемой пробы.

8.2.4 Для точного определения цистеина и метионина применяют предварительное окисление. Для этого обе аминокислоты необходимо превратить в устойчивую окисленную форму до гидролиза. В ходе окисления из цистеина образуется цистеиновая кислота, а из метионина и метионин сульфоксида образуется метионин сульфон.

П р и м е ч а н и е – Важно, что в ходе окисления полностью разлагается тирозин и частично гистидин.

Для проведения процесса окисления в колбу с притертой пробкой вместимостью 250 см^3 вносят 35 мг белок содержащей пробы, добавляют 100 см^3 надмуравьиной кислоты, закрывают пробкой, перемешивают до растворения пробы и выдерживают в холодильнике в течение 15 ч при температуре 4 ºС. Избыток надмуравьиной кислоты разрушают осторожным, по капле, добавлением 12 см^3 бромистоводородной кислоты. Раствор переносят в колбу роторного испарителя вместимостью 250 см^3, упаривают досуха под вакуумом при 2–3 кПа при температуре бани 50 ºС, добавляют 20 см^3 воды и дважды повторяют упаривание досуха.

К сухому остатку добавляют 3 см^3 буферного раствора pH 2,2 и анализируют цистеин и метионин на аминокислотном анализаторе.

9. Проведение измерений

9.1 Хроматографические условия измерений

В соответствии с инструкцией по эксплуатации аминокислотного анализатора проводят его включение, устанавливая в случае необходимости давление инертного газа на входном манометре хроматографа 5 МПа. В соответствии с характеристиками хроматографа задают программируемый метод анализа.

9.2 Условия измерений с фотометрическим детектором

Для хроматографа с фотометрическим детектором и набивной колонкой с катионитом выставляют параметры: канал 1 с длиной волны λ=440 нм, канал 2 с λ=570 нм, температура колонки в термостате 47 ^{o}C; температура нингидринового реактора 125 ^{o}C; рабочее давление 1,6 МПа, поток гелия – 1 см^3/мин; поток элюента 0,2 см^3/мин, время анализа 90 мин. Подача элюента осуществляется по капиллярным шлангам высокого давления с внутренним диаметром 0,2 мм, ввод 20 мм^3 пробы.

В автоматическом аминокислотном анализаторе* реализуется следующая программа подачи элюентов, которая уточняется под конкретный тип анализатора (таблица 1).

Таблица 1

Этап, №	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Время, мин	5,6	11,0	3,0	2,0	9,0	6,5	11,0	9,0	15,0	0,1	8,0	4,0	6,5	0,5
Ввод пробы		x												
Раствор *З*	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
Буфер *А*	x	x										x	x	x
Буфер *Б*			x	x										
Буфер *В*					x	x								
Буфер *Г*							x	x	x					
Буфер *Е*										x	x			
Температура колонки, ^{o}C	47	47	48	48	49	50	52	56	60	60	70	70	55	47
Поток, см^3/мин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2

Через каждые 50–100 анализов и по мере необходимости, когда рабочее давление возрастает, через анализатор пропускают последовательно в течение

10 мин буферные растворы *А* и *Е*, дистиллированную воду, раствор *Ж*, дистиллированную воду.

---

[*] В настоящем стандарте используется автоматический аминокислотный анализатор LC3000 Biotronic. Данная информация является рекомендуемой, приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не исключает возможность использования других средств измерений с аналогичными свойствами.

Для промывки шприца в автосамплере и очистки колонки применяют последовательное введение буферных растворов *А, Д, Е* и *Ж*.

До измерения анализируемых проб проводят калибровку. Для этого, в хроматограф в автоматическом режиме в соответствии с заданной программой вводят 1 мм^3 стандартного раствора аминокислот с концентрацией 2,5 мкмоль в буферном растворе pH 2,2.

В таблицу автоматического обсчета результатов анализа вносят установленные времена выхода пиков для каждой аминокислоты с отклонением ±0,2 мин. Калибровку проверяют и сверяют с ранее полученными калибровками ежедневно, а также после выполнения подряд более десяти анализов.

Для уточнения времени выхода пика для отдельной аминокислоты используют метод внутреннего стандарта. Для этого в раствор пробы вносят известную концентрацию конкретной аминокислоты, превышающую в 3–5 раз уровень ее содержания в пробе, и проводят хроматографирование, устанавливая время выхода нового более интенсивного пика, соответствующего времени выхода введенной аминокислоты.

Для анализа проб с низким, менее 10 мг/кг, содержанием аминокислот проводят хроматографирование с использованием концентрирования раствора в 2–10 раз.

Допускается использование других хроматографических условий, обеспечивающих разделение компонентов пробы.

9.3 Градуировка системы

Приготовленные по 8.1.13 градуировочные растворы подвергают анализу в условиях, выбранных в соответствии с 9.1–9.2. Для каждого уровня анализируют

по три параллельные пробы. Полученные хроматограммы обрабатывают с использованием компьютерной системы обработки данных. Определяют абсолютное время удерживания целевых веществ. С использованием средств программного обеспечения строят градуировочную зависимость площади пика определяемых веществ от концентрации аналита в пробе.

Коэффициент линейной корреляции полученной градуировочной зависимости должен быть не менее 0,99. При невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их. В случае необходимости готовят новые градуировочные растворы.

Проведение градуировки обязательно при замене хроматографической колонки, а также при систематическом получении неудовлетворительных результатов контроля, выполняемого в соответствии с разделом 12.

9.4 Контроль аналитической системы

Контроль выполняют с использованием приготовленных по 8.1.13 градуировочных растворов. Полученный результат анализа не должен отличаться от действительного значения концентрации определяемых веществ в градуировочном растворе более чем на 3 %, относительное стандартное отклонение времени удерживания аналитов не более чем на 5 %. В случае невыполнения указанного критерия стабильности градуировочной характеристики, проводят новую градуировку.

Контроль аналитической системы осуществляется при условиях, указанных в 9.1–9.2 перед началом проведения измерений, а также при смене хроматографической колонки, чистке блоков аналитического прибора и т.д.

9.5 Выполнение измерений

В виалы анализатора вместимостью 1 $см^3$ вносят 0,5 $см^3$ подготовленной по 8.2 пробы и анализируют в анализаторе при условиях, указанных в 9.1–9.2.

Виалы с анализируемой пробой устанавливают в поворачивающийся штатив автоматического термостатированного инжектора. Закол пробы осуществляется в соответствии с программой в хроматографическую колонку с ионообменником с

карбоксильными ионогенными группами в Na^+-форме. Разделение аминокислот происходит автоматически. После разделительной колонки раствор поступает в реактор для проведения цветной реакции с нингидриновым раствором, что позволяет получить фоточувствительный комплекс аминокислот, окрашенный в синий цвет. Его анализируют автоматически в УФ детекторе при 570 нм, пролин и оксипролин – при 440 нм.

Идентификацию индивидуальных аминокислот осуществляют по абсолютным временам удерживания и относительной интенсивности пиков.

Хроматограмма аминокислот с концентрацией 2 мкмоль приведена на рисунке Б.1 (приложение Б).

По значению площади хроматографического пика с использованием установленной градуировочной характеристики и программы обработки данных находят массовую концентрацию аминокислот в анализируемом растворе.

Вычисление массовой доли аналита в анализируемой пробе гидролизата проводят для каждого из двух параллельных определений.

10 Обработка результатов

10.1 В соответствие с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, создают таблицу пиков с использованием программного обеспечения. Расчеты содержания аминокислоты и площади пика выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

10.2 Массовую долю индивидуальной аминокислоты X, мг/кг, вычисляют по формуле

$$X = C_{ст} \cdot S_x \cdot V_р / S_{ст} \cdot m , \quad (1)$$

где $C_{ст}$ – массовая концентрация индивидуальной аминокислоты в градуировочном растворе, мкг/см^3;

S_x – площадь пика индивидуальной аминокислоты в анализируемой пробе, усл.ед.;

$S_{ст}$ – площадь пика индивидуальной аминокислоты в градуировочном растворе, усл.ед.;

$V_р$ – объём раствора для растворения аналита после пробоподготовки, см^3;

m – масса пробы, г.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение двух параллельных измерений, округленное до второго десятичного знака.

Примечания

1 Результат выражают в мг/кг, что равнозначно получаемой по формуле (1) размерности мкг/г.

2 Для сопоставления полученной величины массовой доли аминокислоты с международными таблицами данных содержания аминокислот в белках полученный результат выражают в г/100 г белка. При этом содержание белка в анализируемой пробе предварительно определяют по ГОСТ 25011 (по методу Къельдаля).

Типичный состав аминокислот белка животного происхождения приведен в приложении В.1.

11 Метрологические характеристики

11.1 Метрологические характеристики метода при доверительной вероятности P = 0,95 приведены в таблице 2.

Таблица 2

Наименование показателя	Диапазон измерений массовой доли аминокислоты, мг/кг	Границы относительной погрешности, δ,%	Предел повторяемости, r, мг/кг	Предел воспроизводимости, R, мг/кг
Массовая доля аминокислоты, мг/кг	До 50 включ.	27	18 $x_{ср}$	20 $X_{ср}$
	Св. 50 до 1000 включ.	16	15 $x_{ср}$	18 $X_{ср}$
$x_{ср}$ – среднеарифметическое результатов двух параллельных измерений, мг/кг. $X_{ср}$ – среднеарифметическое результатов двух измерений, выполненных в разных лабораториях, мг/кг.				

Примечание – Нижний предел обнаружения аминокислот животного происхождения определяется индивидуальной чувствительностью применяемого датчика. Для использованных детекторов он соответствует концентрации 0,500± 0,006 мкмоль/см^3 в анализируемом растворе

11.2 Расхождение между результатами двух параллельных измерений, выполненных одним оператором при анализе одной и той же пробы с использованием одних и тех же средств измерений и реактивов, не должно

превышать предела повторяемости (сходимости), *r*, значения которого приведены в таблице 2.

Результат анализа при доверительной вероятности *P* = 0,95 представляют в виде

$$(x_1 - x_2) \leq r \,, \qquad (2)$$

где x_1 и x_2 – результаты параллельных измерений, мг/кг;

r – предел повторяемости, мг/кг.

11.3 Расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости, *R*, значения которого приведены в таблице 2.

Результат анализа при доверительной вероятности *P* = 0,95 представляют в виде

$$(X_1 - X_2) \leq R \,, \qquad (3)$$

где X_1 и X_2 – результаты двух определений, выполненных в разных лабораториях, мг/кг;

R – предел воспроизводимости, мг/кг.

11.4 Границы относительной погрешности (δ), находящиеся с доверительной вероятностью *P*=0,95, при соблюдении условий настоящего стандарта, не должны превышать значений, приведенных в таблице 2.

12 Контроль точности результатов измерений

12.1 Процедуру контроля стабильности результатов измерений (повторяемости, промежуточной прецизионности и погрешности) проводят в соответствии с порядком, установленным в лаборатории, по ГОСТ ИСО 5725-6.

12.2 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости), осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений не должно превышать предела повторяемости (*r*). Значения r приведены в таблице 2.

12.3 Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-2. Расхождение между результатами измерений, полученными двумя

лабораториями, не должно превышать предела воспроизводимости (*R*). Значения *R* приведены в таблице 2.

Приложение А

(справочное)

А.1 Перечень и систематическое международное наименование аминокислот животного происхождения приведены в таблице А.1.

Таблица А.1 – Перечень и систематическое международное наименование аминокислот животного происхождения

Наименование аминокислоты	Систематическое международное наименование	Обозначение	
Глицин	Glycine	Гли	Gly
Аланин	Alanine	Ала	Ala
Валин*	Valine	Вал	Val
Лейцин*	Leucine	Лей	Leu
Изолейцин*	Isoleucine	Иле	Ile
Пролин	Proline	Про	Pro
Фенилаланин*	Phenylalanine	Фен	Phe
Тирозин	Tyrozine	Тир	Tyr
Метионин*	Methionine	Мет	Met
Цистеин	Cystein	Цис	Cys
Аспарагиновая кислота	Aspartic acid	Асп	Asp
Аспарагин	Asparagine	Асн	Asn
Глутаминовая кислота	Glutamic acid	Глу	Glu
Глутамин	Glutamine	Глн	Gln
Лизин*	Lysine	Лиз	Lys
Аргинин**	Arginine	Арг	Arg
Гистидин**	Histidine	Гис	His
Серин	Serine	Сер	Ser
Треонин*	Threonine	Тре	Thr

* незаменимые аминокислоты
** полунезаменимые аминокислоты

П р и м е ч а н и е – Триптофан в аминокислотом анализе не определяют вследствие его разрушения кислотой. Глутамин определяется в составе глутаминовой кислоты, аспарагин – в составе аспарагиновой кислоты

Приложение Б

(справочное)

Б.1 Хроматограмма аминокислот с концентрацией 2 мкмоль приведена на рисунке Б.1.

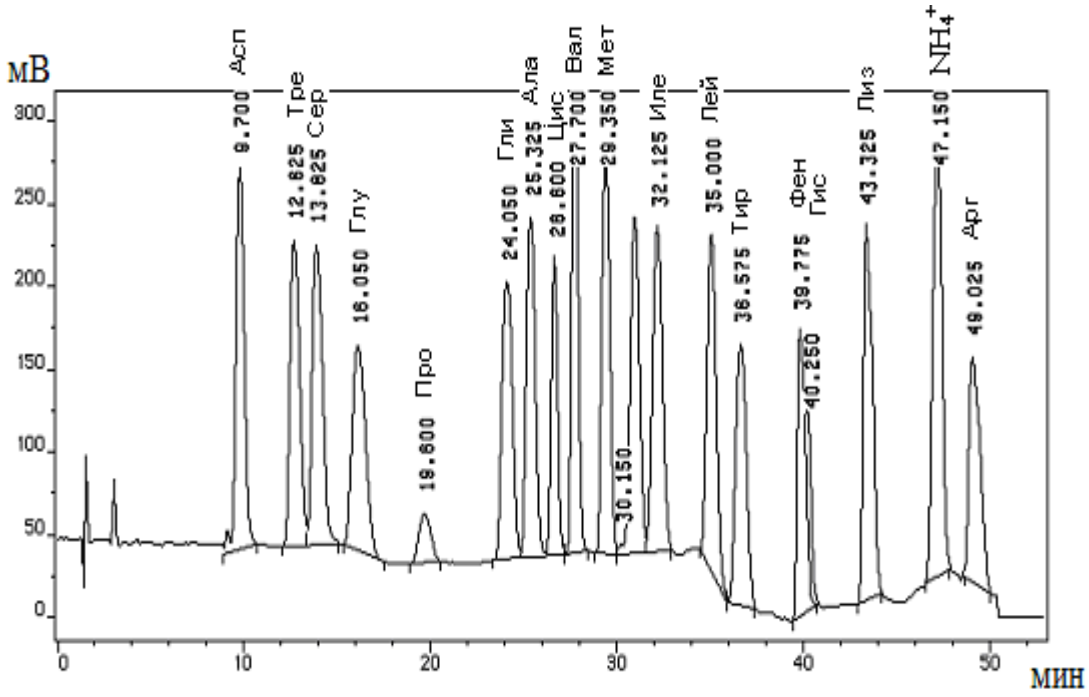

Рисунок Б.1 – Хроматограмма аминокислот с концентрацией 2 мкмоль

Приложение В

(справочное)

В.1 Типичный аминокислотный состав животного белка в г/100г белка записывают следующим образом:

Asp – 9 .2; Thr – 3,5; Ser – 3,6; Glu – 19,6; Pro – 3,7; Gly – 6,0; Ala – 5,2; Cys – 2,1; Val – 4,9; Met – 2,9; Iley – 3,6; Ley – 6,2; Tyr – 3,9; Phe – 3,7; His – 3,8; Lys – 7,5; Arg – 7,7.

Всего 97,4 г/100 г белка.

Библиография

[1] Патент RU №128878 U1 Устройство для гидролиза животного белка в составе пищевых продуктов

УДК 615:547.466 МКС 67.120.10

Ключевые слова: мясо, мясные продукты, мясосодержащие продукты, белок, состав, аминокислоты, определение, хроматографический метод

Разработчики стандарта:

ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»

Директор — А.Б. Лисицын

Заместитель директора по научной работе — А.А. Семенова

Заместитель директора по научной работе — О.А.Кузнецова

Руководитель отдела технического регулирования и систем управления качеством — З.А. Юрчак

Руководитель «Научно-исследовательского испытательного центра» — И.М. Чернуха

И.о. заведующего лабораторией научно-методических работ, биологических и аналитических исследований — А.В. Куликовский

Главный научный сотрудник лаборатории научно-методических работ, биологических и аналитических исследований — А.Н. Иванкин