

---

---

**Корма для животных. Определение  
содержания волокна и лигнина с  
помощью кислотного детергента**

*Animal feeding stuff – Determination of acid detergent fibre (ADF) and  
acid detergent lignin (ADL) contents*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 13906:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/042e19b7-8dd5-47d4-b5b6-0301e3599717/iso-13906-2008>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер  
ISO 13906:2008(R)

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 13906:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/042e19b7-8dd5-47d4-b5b6-0301e3599717/iso-13906-2008>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2008

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 734 09 47  
E-mail copyright @ iso.org

Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	iv
1 Область применения .....	1
2 Нормативные ссылки .....	1
3 Термины и определения .....	1
4 Сущность метода .....	2
5 Реактивы .....	2
6 Аппаратура .....	3
7 Отбор проб .....	4
8 Подготовка образца для испытания .....	4
9 Проведение испытания .....	5
10 Расчет и обработка результатов .....	7
11 Прецизионность .....	8
12 Протокол испытания .....	10
Приложение А (информативное) Результаты межлабораторных испытаний .....	12
Приложение В (информативное) Результаты межлабораторных испытаний .....	16
Библиография .....	19

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/042e19b7-8dd5-47d4-b5b6-0301e3599717/iso-13906-2008>

## Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) представляет собой всемирную федерацию, состоящую из национальных органов по стандартизации (комитеты-члены ISO). Работа по разработке международных стандартов обычно ведется Техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в теме, для решения которой образован данный технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, поддерживающие связь с ISO, также принимают участие в работе. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, установленными в Части 2 Директив ISO/IEC.

Основное назначение технических комитетов заключается в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые Техническими комитетами, направляются комитетам-членам на голосование. Для их опубликования в качестве международных стандартов требуется одобрение не менее 75 % комитетов-членов, участвовавших в голосовании.

Внимание обращается на тот факт, что отдельные элементы данного документа могут составлять предмет патентных прав. ISO не несет ответственность за идентификацию каких-либо или всех подобных патентных прав.

ISO 13906 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 10, *Корма для животных*.

ISO 13906:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/042e19b7-8dd5-47d4-b5b6-0301e3599717/iso-13906-2008>

# Корма для животных. Определение содержания волокна и лигнина с помощью кислотного детергента

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** — Применение данного международного стандарта может включать опасные материалы, операции и оборудование. Настоящий международный стандарт не ставит целью решить все проблемы, угрожающие безопасности и связанные с использованием настоящего документа. Пользователь данного международного стандарта сам несет ответственность за установление соответствующих правил безопасности и охраны здоровья и определение применимости ограничений, налагаемых местными регламентами, перед его использованием.

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод определения нерастворимого остатка волокна, с помощью кислотного детергента (ADF) и лигнина с помощью кислотного детергента (ADL) во всех типах кормов для животных. Предел определения составляет 1 %-ную массовую долю для ADF и 1,5 %-ную массовую долю для ADL.

Используется гравиметрический типовой и контрольный метод.

## 2 Нормативные ссылки

Нижеследующие документы являются обязательными для применения данного документа. Для датированных ссылок действительно только указанное издание. В случае недатированных ссылок используется последняя редакция документа, на который дается ссылка (включая все изменения).

ISO 6498, *Корма для животных. Приготовление образцов для испытания*

## 3 Термины и определения

Применительно к данному документу используются следующие термины и определения.

### 3.1

**содержание волокна, поглощающего кислотный детергент**

**содержание ADF**

**acid detergent fibre content**

**ADF content**

массовая доля волокнистого остатка, полученного после обработки детергентом катионного типа в серной кислоте концентрацией 0,5 моль/л и состоящего, в основном, из целлюлозы, лигнина и нерастворимых протеиновых комплексов

**ПРИМЕЧАНИЕ** Массовая доля ADF выражается в процентах.

3.2

**содержание лигнина, поглощающего кислотный детергент**  
**содержание ADL**  
**acid detergent lignin content**  
**ADL content**

массовая доля остатка, получаемого после того, как целлюлоза и другой органический материал солюбилизируют 72 %-ным раствором (по массе) (12,00 моль/л) серной кислоты

ПРИМЕЧАНИЕ Массовая доля ADL выражается в процентах.

**4 Сущность метода**

ADF определяют на первом этапе данного метода.

Раствор катионного детергента используют для удаления неустойчивых к воздействию кислоты углеводов, протеина, который не образует комплексов в виде продуктов реакции Майяра (Maillard) (поврежденные теплом), и жиров. Оставшийся волокнистый остаток представляет собой, главным образом, целлюлозу и лигнин (растительные продукты) или нерастворимые протеиновые комплексы (продукты животного происхождения и поврежденные теплом корма). Остаток взвешивают для определения ADF.

На втором этапе остаток солюбилизируют 72 %-ным (по массе) раствором серной кислоты (12,00 моль/л), оставляя лигнин (ADL), который определяют гравиметрическим способом.

iTeh STANDARD PREVIEW  
 (standards.iteh.ai)

**5 Реактивы**

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет особых указаний, и только дистиллированную или деионизированную воду или воду равноценной чистоты.

**5.1 Раствор кислотного детергента.** Добавляют 20 г бромид цетил(триметил)аммония (технической чистоты) в 1 л предварительно стандартизованного раствора серной кислоты концентрацией 0,5 моль/л. Взбалтывают для улучшения растворения.

**5.2 Серная кислота, 72 % -ный раствор (по массе) (12,00 моль/л).**

Стандартизованную серную кислоту (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) с относительной плотностью 1,634 при температуре 20 °C или 12,00 моль/л получают следующим образом.

Рассчитывают массу, в граммах, кислоты,  $m(H_2SO_4)$ , и массу, в граммах, воды,  $m(H_2O)$ , необходимых для приготовления 1 000 мл раствора, по Формулам (1) и (2):

$$m(H_2SO_4) = \frac{100 \times 98,08 \times 12}{w(H_2SO_4)} \tag{1}$$

где  $w(H_2SO_4)$  определенная массовая доля серной кислоты, выраженная в процентах.

$$m(H_2O) = 1000 \times 1,634 - m(H_2SO_4) \tag{2}$$

где 1,634 относительная плотность 72 %-ного (по массе) раствора серной кислоты.

Взвешивают воду в 1 000 -мл мерной колбе и добавляют рассчитанное количество серной кислоты медленно при периодическом помешивании круговыми движениями. Охлаждают колбу на водяной бане, добавляя требуемое количество кислоты. Охлаждают до температуры 20 °C и проверяют объем. Мениск должен располагаться в 0,5 см от калибровочной отметки при температуре 20 °C. Если объем

слишком большой, удаляют 5 мл воды и добавляют 4,55 мл серной кислоты. Если объем слишком маленький, отбирают 1,5 мл и добавляют 2,5 мл воды. При необходимости повторяют.

**5.3** **Вспомогательное средство для фильтрации**, диатомовая земля<sup>1)</sup>.

**5.4** **Ацетон**, технической чистоты.

**5.5** **n-Октанол**, противопенное средство.

## 6 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

**6.1** **Аналитические весы.**

**6.1.1** **Аналитические весы**, обеспечивающие взвешивание с точностью до 1 мг, со считыванием 0,1 мг.

**6.1.2** **Аналитические весы**, с диапазоном измерения до 2 500 г, считываемые до 1 г, для взвешивания серной кислоты (5.2).

**6.2** **Мельница**, мельница-циклон или измельчитель, или роторная мельница или аналогичная, дающая средний размер частиц порядка 0,22 мм - 0,26 мм.

**6.3** **Сушильная печь.**

**6.3.1** **Вентилируемая печь**, обеспечивающая работу при температуре  $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  или  $130\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

**6.3.2** **Вентилируемая печь**, обеспечивающая поддержание температуры  $60\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

Чтобы ускорить сушку влажных образцов без создания искусственных волокон, можно также использовать **вакуумную печь**, поддерживаемую при температуре  $60\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

**6.4** **Установка с обратным холодильником**, с индивидуальными нагревателями и холодильниками с водяным охлаждением. Можно использовать любую традиционную установку, обычно применяемую для определений сырого волокна или волокна определяемого с помощью обработанного амилазой нейтрального детергента (aNDF). Калибруют нагреватель, так чтобы 50 мл воды закипало через 4 мин - 5 мин при использовании водяных холодильников. Можно использовать установку типа Fibertec<sup>2)</sup>, на которой 50 мл воды закипает в течение 10 мин.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Такие установочные параметры приведут к заметному движению частиц при кипячении с обратным холодильником.

**6.5** **Тигли с дисками из фриттового стекла**. Грубой пористости (размер пор от 40 мкм до 60 мкм) тигли вместимостью от 40 мл до 50 мл, или типа Fibertec P2<sup>2)</sup> (размер пор от 40 мкм до 100 мкм, вместимостью от 26 мл до 28 мл). Новые тигли моют и прокаливают при температуре  $525\text{ °C} \pm 15\text{ °C}$  в течение 1 ч. Использованные тигли после применения прокаливают при температуре  $525\text{ °C} \pm 15\text{ °C}$  в течение 3 ч, удаляя золу при переворачивании в раствор детергента и обработке ультразвуком в

1) Целит, промытый кислотой, и Целит 545 AW являются примерами подходящей продукции, имеющейся в продаже. Эта информация предоставляется для удобства пользователей данного международного стандарта и не указывает на предпочтение, оказываемое этим продуктам со стороны ISO. Можно использовать другие продукты, если они дают аналогичные результаты.

2) Пример подходящей продукции, имеющейся в продаже. Эта информация предоставляется для удобства пользователей данного международного стандарта и не указывает на предпочтение, оказываемое этим продуктам со стороны ISO.

течение от 7 мин до 10 мин. Споласкивают тигли в горячей воде и замачивают в воде при комнатной температуре не менее чем на 30 мин.

Периодически проверяют скорость фильтрации следующим образом. Наполняют каждый тигель объемом 50 мл дистиллированной воды (25 мл для тиглей типа Fibertec P2<sup>2)</sup>) и записывают время, необходимое для полного просушивания без вакуума [например, 180 с ± 60 с для тигля Gooch<sup>2)</sup> или 75 с ± 30 с для P2]. Если время сушки < 100 с (или < 30 с для P2), тигель бракуют. Если время < 120 с (или < 45 с для P2), проверяют диск из фриттового стекла на наличие трещин. Если фильтрование занимает > 240 с (или > 105 с для P2), моют тигель кислотным или щелочным моющим средством (Ссылка [4]). Если промывание не улучшает скорости фильтрования, тигель бракуют.

**6.6 Вакуумный коллектор для фильтрования.** Подходящее устройство [например, блок холодной экстракции типа Fibertec<sup>2)</sup>], которое позволяет адекватным образом смочить волокнистый остаток.

**6.7 Печь для прокаливания, 525 °C ± 15 °C.**

**6.8 Стаканы для кипячения с обратным холодильником.** Альтернатива установке (6.4), стаканы Берцелиуса вместимостью 600 мл ( Berzelius) с обратными холодильниками, например, изготовленные из круглодонных колб вместимостью 500 мл.

## 7 Отбор проб

В лабораторию должна быть прислана репрезентативная проба. Она не должна быть повреждена или изменена при перевозке или хранении.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем международном стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб описан в ISO 6497.

## 8 Подготовка образца для испытания

Образец для испытания готовят в соответствии с ISO 6498.

Сокращают лабораторную пробу до примерно 100 г (эквивалент сухой массы) и помещают половину во влагонепроницаемую герметичную емкость для определения общего содержания влаги. Сушат оставшийся влажный материал (> 15 % влаги по массе) до содержания влаги < 15 % по массе в вентилируемой печи (6.3.2) при температуре < 60 °C. Просушивание необходимо выполнять при температуре < 60 °C для предотвращения образования ложного волокна и лигнина. Измельчают сухие (< 15 % влаги по массе) образцы для испытания на мельнице (6.2).

Измельчают кусковой материал, так что основная часть волокнистого материала прошла через измельчитель в последнюю очередь. Материал, оставшийся в измельчителе не отбрасывают, а добавляют к измельченному образцу для испытания.

Предварительная экстракция требуется для испытываемых образцов, содержащих > 10 % по массе жира, и рекомендуется для образцов, содержащих > 5 % по массе жира.

Взвешивают образцы для испытания в предварительно тарированных, просушенных в печи тиглях, помещают тигель на коллектор для фильтрования, экстрагируют четыре раза объемом от 30 мл до 40 мл ацетона, каждый раздавая ацетону смочить материал в течении 3 мин - 5 мин , вакууммируют для полного удаления следов ацетона, сушат на воздухе в течение 10 мин - 15 мин, и переносят остаток в стакан для кипячения с обратным холодильником для определения волокна. Тот же самый тигель используют для сбора остатка волокна для каждой анализируемой пробы после экстракции кислотным детергентом.



Для установки типа Fibertec<sup>2</sup>) помещают тигель в блок холодной экстракции и наполняют тигель объемом 25 мл ацетона (5.4), оставляют на 3 мин - 5 мин и фильтруют с приложением вакуума. Повторяют процедуру три раза.

ПРИМЕЧАНИЕ Для упрощения фильтрования 1,00 г средства для облегчения фильтрации (5.3) можно добавить в тигель перед добавлением пробы.

## 9 Проведение испытания

### 9.1 ADF

#### 9.1.1 Общие положения

Сушат пустые тигли в печи (6.3.1) при температуре  $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  в течение  $> 4\text{ ч}$  [1 ч, если тигель взят из печи после прокаливании (6.7)] и записывают тарированную массу,  $m_1$ .

#### 9.1.2 Традиционная установка

Берут в стакан Берцелиуса (6.8) навеску анализируемой пробы просушенного материала или материала в состоянии после получения массой  $1\ 000\text{ мг} \pm 2\text{ мг}$ , и записывают как  $m_2$ .

Материалы с содержанием влаги  $> 15\%$  по массе должны иметь скорректированную массу, чтобы обеспечить эквивалентную массу сухого вещества. Если требуется преобразование результатов на основе сухого вещества, одновременно взвешивают анализируемую пробу для определения влагосодержания.

Непосредственно перед нагреванием с обратным холодильником добавляют 100 мл раствора кислотного детергента (5.1) при комнатной температуре. Нагревают до кипения более 5 мин - 10 мин и, если необходимо, слегка убавляют нагрев и добавляют 2 - 4 капли *n*-октанола (5.5), чтобы избежать образования пены, обеспечивая при этом умеренное взбалтывание частиц. Через 5 мин - 10 мин кипячения споласкивают со стенок сосуда материал с помощью тонкой струйки раствора кислотного детергента (добавляя объем  $< 5\text{ мл}$ ). Кипятят в течение  $60\text{ мин} \pm 5\text{ мин}$  с момента достижения раствором температуры кипения.

Снимают стаканы с нагревателей, перемешивают круговыми движениями и фильтруют в тигель (6.5). Не переворачивая стакан, тонкой стружкой кипящей воды смывают все частицы в тигель. Удаляют кислотный детергент и воду для споласкивания с помощью минимального вакуума. Перекрывают вакуум и наполняют тигель объемом примерно 40 мл воды при температуре от  $90\text{ °C}$  до  $100\text{ °C}$ , перемешивают, чтобы разрушить уплотненный после фильтрования осадок, и дают увлажниться в течение 3 мин - 5 мин. Повторяют смачивание водой дважды и сушат вакуумом. Споласкивают боковые стенки и дно тигля, чтобы убедиться, что все следы кислоты удалены (остатки кислоты концентрируются при сушке и вызывают обугливание осадка и, соответственно, низкие значения содержания волокна).

Добавляют 30 мл - 40 мл ацетона (5.4), перемешивают для размельчения всех кусков и полного смачивания ацетоном всех частиц, выдерживают в течение 3 мин - 5 мин и повторяют до полного пропадания окрашивания (обычно двух циклов смачивания ацетоном бывает достаточно). Остатки ацетона удаляют с помощью вакуума, сушат  $> 5\text{ ч}$ , желательно в течение ночи, при температуре  $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  в вентилируемой печи (6.3.1), охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивают. Записывают полученную массу как  $m_3$ .

#### 9.1.3 Установка типа Fibertec<sup>2</sup>)

Взвешивают в предварительно просушенный тигель (6.5) тарированной массы,  $m_1$ , анализируемую пробу просушенного или полученного материала массой  $1\ 000\text{ мг} \pm 2\text{ мг}$ , и записывают массу как  $m_2$ . Для облегчения фильтрования добавляют 1,00 г средства для фильтрования (5.3) в тигель перед

помещением в него пробы. Помещают тигель в блок горячей экстракции установки Fibertec<sup>2</sup>) и добавляют 100 мл раствора кислотного детергента (5.1). Добавляют 2 - 4 капли *n*-октанола (5.5) для предотвращения образования пены и нагревают до температуры кипения. Регулируют нагреватель и дают прокипеть в течение 60 мин ± 5 мин. Измеряют время с момента достижения раствором температуры кипения.

раствор кислотного детергента удаляют и промывают трижды водой при температуре 90 °C – 100 °C. используют порции воды объемом 30 мл и сушат вакуумом между промываниями.

Помещают тигель в блок холодной экстракции и наполняют тигель объемом 25 мл ацетона (5.4). Фильтруют. Повторяют процедуру еще раз.

Выпаривают растворитель и сушат тигли при температуре 130 °C ± 2 °C в течение 2 ч или при температуре 103 °C ± 2 °C в течение не менее 5 ч. Охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивают с точностью до 0,000 1 г. Записывают массу как  $m_3$ .

## 9.2 Содержание ADL

### 9.2.1 Традиционная установка

Помещают тигель, содержащий извлеченное кислотным детергентом волокно в 50 мл стакан для поддержания тиглей или устанавливают тигли в неглубокий эмалированный лоток. Наливают на содержимое тигля раствор серной кислоты (5.2), охлажденный до 15 °C и перемешивают стеклянной палочкой до образования однородной пасты, разбивая все комочки. наполняют тигель примерно до половины кислотой и перемешивают. Стеклянную палочку оставляют в тигле; снова наполняют серной кислотой (5.2), охлажденной до температуры 15 °C, и перемешивают постоянно по мере приливания кислоты, держа тигель при температуре от 20 °C до 23 °C (если необходимо, охлаждают). Спустя 3 ч, фильтруют, по возможности, без потерь под вакуумом и промывают горячей водой, пока лакмусовая бумажка не покажет отсутствие кислоты. Споласкивают стенки тигля и извлекают палочку для перемешивания. Сушат тигель при температуре 130 °C ± 2 °C в течение 2 ч или при 103 °C ± 2 °C в течение не менее 5 ч, охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивают. Записывают массу как  $m_4$ . Прокаливают тигель при температуре 525 °C ± 15 °C в течение не менее 3 ч или пока он не освободится от сажи. Охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивают. Записывают массу как  $m_5$ .

### 9.2.2 Установка типа Fibertec<sup>2</sup>)

Помещают стеклянную палочку в тигель для перемешивания. Добавляют 25 мл серной кислоты (5.2), охлажденной до температуры 15 °C. Перемешивают стеклянной палочкой и отфильтровывают спустя 3 ч. Перемешивают каждый час. Альтернативно, используют противодавление для разбивания комочков. Промывают водой до освобождения от кислоты. Сушат тигли при температуре 130 °C ± 2 °C в течение 2 ч или при температуре 103 °C ± 2 °C в течение не менее 5 ч. Охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивают. Записывают массу как  $m_4$ . Прокаливают тигель при температуре 525 °C ± 15 °C в течение не менее 3 ч или до исчезновения сажи. Охлаждают до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивают. Записывают массу как  $m_5$ .

## 9.3 Обеспечение качества

**9.3.1** Включают не менее одного образца внутреннего контроля или образца контроля качества (QC) и два холостых опыта для первых 20 - 30 проб в серии и добавляют 1 QC и 1 холостой опыт на каждые дополнительные 20 – 30 анализируемых проб.

**9.3.2** Включают не менее одного набора дубликатов в каждую серию, если выполняются отдельные определения. Дубликаты не должны анализироваться последовательно, один анализируют вначале и один в конце серии.

**9.3.3** Изменение массы пустых тиглей должно быть  $< 0,010$  0 г после экстракции или прокаливания. Если массы пустых тиглей изменяются более чем на 10 мг или массы тиглей после прокаливания будут меньше чем массы пустых тиглей, значит тигли были плохо промыты или имеются проблемы с весами или техникой взвешивания.

## 10 Расчет и обработка результатов

### 10.1 ADF

Рассчитывают содержание ADF в полученной пробе,  $w_1$ , выражают в процентах как массовую долю, по формуле (3) или содержание ADF на основе сухого вещества,  $w_2$ , выражают в процентах как массовую долю, по Формуле (4).

Для не подвергавшихся просушиванию материалов (образец для испытания имеет такую же влажность как лабораторная проба):

$$w_1 = 100 \times \frac{m_3 - m_1 - \bar{m}_{b2} - \bar{m}_{b1}}{m_2} \quad (3)$$

Для просушенных материалов (лабораторную пробу просушивают для получения образца для анализа):

$$w_2 = 100 \times \frac{m_3 - m_1 - \bar{m}_{b2} - \bar{m}_{b1}}{m_2 w_d} \quad (4)$$

где

$m_1$  масса, в граммах, тигля;

$m_2$  масса, в граммах, испытуемого образца;

$m_3$  масса, в граммах, тигля и остатка;

$\bar{m}_{b1}$  средняя масса, в граммах, всех холостых опытов после сушки в печи перед экстракцией кислотным детергентом;

$\bar{m}_{b2}$  средняя масса, в граммах, всех холостых опытов после сушки в печи после экстракции кислотным детергентом;

$w_d$  процент по массе сухого вещества, деленный на 100.

### 10.2 ADL

Рассчитывают содержание ADL ( $H_2SO_4$  лигнин) на основе после получения,  $w_3$ , выраженное в процентах по массе по формуле (5) или ADL ( $H_2SO_4$  лигнин) на основе сухой массы,  $w_4$ , выраженное в процентах по массе, по формуле (6).

Для не подвергавшихся просушиванию материалов (образец для испытания имеет такую же влажность как лабораторная проба):

$$w_3 = 100 \times \frac{m_4 - m_5 - \bar{m}_{b3} - \bar{m}_{b4}}{m_2} \quad (5)$$