

# МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

# ISO 17180

Первое издание  
2013-04-15

---

---

## Корма для животных. Определение содержания лизина, метионина и треонина в коммерческих аминокислотных продуктах и премиксах

*Aliments des animaux — Détermination de lysine,  
methionine and threonine in commercial amino acid  
products and premixtures*

ISO 17180:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>

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



Ссылочный номер  
ISO 17180:2013(R)

© ISO 2013

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 17180:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2013

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 по адресу ниже или членом ISO в стране регистрации пребывания.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	iv
<b>1 Область применения.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Принцип .....</b>	<b>1</b>
<b>3 Реактивы и материалы .....</b>	<b>1</b>
<b>4 Аппаратура.....</b>	<b>3</b>
<b>5 Процедура .....</b>	<b>4</b>
5.1 Подготовка проб .....	4
5.2 Количество подготовленных экстрактов .....	4
5.3 Экстракции с использованием разведения путем взвешивания .....	4
5.4 Экстракция с использованием объемного разведения .....	5
5.5 Хроматография .....	5
<b>6 Обработка результатов .....</b>	<b>5</b>
6.1 Принцип метода и контроль градуировки .....	5
6.2 Расчет, если применяется весовое разведение .....	6
6.3 Расчет, если применяется объемное разведение .....	6
<b>7 Прецизионность .....</b>	<b>7</b>
7.1 Межлабораторные испытания .....	7
7.2 Повторяемость .....	7
7.3 Воспроизводимость .....	8
<b>8 Протокол испытаний.....</b>	<b>8</b>
<b>Приложение А (информативное) Данные совместных исследований.....</b>	<b>9</b>
<b>Библиография.....</b>	<b>11</b>

ISO 17180:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>

## Предисловие

ISO (Международная организация по стандартизации) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый член организации, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в этих работах. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, указанными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные техническими комитетами, рассылаются членам организации на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 75 % членом организации, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не должна нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав.

ISO 17180 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 10, *Корма для животных*.

STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 17180:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/de5da04a-8361-4649-b392-97696df330ba/iso-17180-2013>

## Корма для животных.

# Определение содержания лизина, метионина и треонина в коммерческих аминокислотных продуктах и премиксах

**ВНИМАНИЕ** — Настоящий стандарт может включать использование опасных материалов, операций и оборудования. Этот документ не претендует на полноту описания всех рисков для безопасности, связанных с его использованием. Установление соответствующих правил техники безопасности для здорового образа жизни является обязанностью пользователя данного документа, поэтому следует определить применимость локальных нормативных ограничений перед его использованием.

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод количественного определения свободных (не входящих в состав белков) лизина, метионина и треонина в коммерческих продуктах и премиксах, содержащих более 10 % массовой доли соответствующей аминокислоты. Он не различает D- и L-формы.

**ПРИМЕЧАНИЕ** Для целей настоящего международного стандарта термин "аминокислота", используемый в [пункте 2](#) и далее, относится к лизину, метионину и треонину.

## 2 Принцип

Пробы обрабатывают раствором соляной кислоты, затем разбавляют буфером цитрата натрия. Добавляется внутренний стандарт норлейцина, аминокислоты разделяют на аминокислотном анализаторе или высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с использованием катионообменной смолы и буфера цитрата натрия в качестве элюента. Аминокислоты определяются колориметрически с последующим постколоночным взаимодействием с нингидрином или по флуоресцентному детектору после постколоночного взаимодействия с орто-фталдигальдегидом (OPA).

## 3 Реактивы и материалы

Используют только реактивы признанной аналитической чистоты, если не указано иное.

**3.1 Вода**, дважды дистиллированная или эквивалентная по чистоте (проводимость < 10 мкСименс/см).

### 3.2 Стандартные вещества

**3.2.1 Лизин HCl кристаллический** с массовой долей основного вещества не менее 99 %, высушенный под вакуумом в эксикаторе в течение 2 дней над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> перед использованием.

**3.2.2 Треонин кристаллический** с массовой долей основного вещества не менее 99 %, высушенный под вакуумом в эксикаторе в течение 2 дней над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> перед использованием.

**3.2.3 Метионин кристаллический** с массовой долей основного вещества не менее 99 %, высушенный под вакуумом в эксикаторе в течение 2 дней над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> перед использованием.

**3.3 Норлейцин кристаллический** для использования в качестве внутреннего стандарта чистоты не менее 99 %, высушенный под вакуумом в эксикаторе в течение 2 дней над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> перед использованием.

**3.4 Натрия гидроксида раствор**, c(NaOH) = 7,5 моль/л, для корректировки pH буфера цитрата натрия. Тщательно растворить 300 г гидроксида натрия в воде ([3.1](#)) и доводят до 1 л.

**3.5 Соляная кислота**,  $\gamma$  (HCl) = 370 г/кг.

**3.6 Натрия цитрат дигидрат.**

**3.7 2,2'-Тиодитанол** (тиодигликоль).

**3.8 Фенол кристаллический** с массовой долей основного вещества не менее 98,5 %.

**3.9 Натрий лимоннокислый буфер**, pH 2,20.

Растворить 19,61 г натрия цитрата дигидрат (3.6), 5 мл тиодигликоля (3.7), 1 г фенола (3.8) и 16,5 мл соляной кислоты (3.5) в 800 мл воды. Регулировать pH 2,2 несколькими каплями HCl (3.5) или раствора NaOH (3.4). Для сохранения буферного раствора используют кристаллы фенола.

Буфер цитрата натрия может быть также подготовлен с помощью лимонной кислоты и хлорида натрия.

**3.10 Раствор соляной кислоты**,  $c(\text{HCl}) = 0,1$  моль/л.

Берут 8,2 мл соляной кислоты (3.5), разбавляют около 900 мл воды (3.1). Тщательно перемешивают и доводят до 1 л водой.

**3.11 Стандартные растворы аминокислот.**

**3.11.1 Внутренний стандартный раствор норлейцина**,  $c(\text{Nle}) = 2,5$  ммоль/л.

Растворяют 0,328 г норлейцина (3.3) и количественно переносят с 0,1 моль/л HCl (3.10) в мерную колбу 1 л.

Хранят при температуре ниже 5 °C в течение не более 6 месяцев.

**3.11.2 Основные стандартные растворы аминокислот**,  $c = 2,5$  ммоль/л.

Готовят основной стандартный раствор для каждой аминокислоты

Стандартные растворы должны содержать только анализируемые аминокислоты, т.е. лизин, треонин или метионин. Коммерчески доступны смешанные стандартные раствороводятеры, например, содержащие 18 аминокислот, но они не дают оптимальных результатов.

Переносят 0,456 г лизина-HCl (3.2.1), 0,297 г треонина (3.2.2) и 0,373 г метионина (3.2.3) в 1 л мерную колбу и доводят объем до метки 0,1 моль/л HCl (3.10).

Хранят при температуре ниже 5 C в течение не более 6 месяцев.

**3.11.3 Градуировочные растворы аминокислот.**

**3.11.3.1 Весовое разведение.** Взвешивают 2,5 мл основного стандартного раствора каждой аминокислоты  $m_{aa}$  (3.11.2) и 2,5 мл основного стандартного раствора норлейцина  $m_{\text{Nle}}$  (3.11.1) в 50 мл мерной колбе. Доводят объем до метки буфером натрия цитрата (3.9).

Хранят раствор при температуре ниже 5 °C в течение не более 1 недели.

**3.11.3.2 Объемное разведение.** С помощью пипетки (4.4) или дилютора (4.7), растворяют в равных объемах основные стандартные растворы аминокислот (3.11.2) и внутренний стандартный раствор норлейцина (3.11.1) в буфере цитрата натрия (3.9), например: 50 мкл раствора норлейцина и 50 мкл раствора аминокислот разбавляют в дилюторе буфером цитрата натрия (3.9) до 1 000 мкл.

**3.12 Элюирующие буферы для катионнообменной колонки.** Используют коммерчески доступные буферы или готовят их в соответствии с требованиями, установленными производителем анализатора. Обычно используют от трех до пяти буферных растворов, содержащих карбонат или цитрат натрия и небольшие количества добавок или консервантов.

**3.13 Нингидрин или ОРА.** Используют имеющиеся в продаже реагенты или готовят их в соответствии с требованиями, установленными производителем анализатора.

## 4 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

**4.1 Стеклянные стаканы,** вместимостью 1 000 мл.

**4.2 Мерные колбы,** объемом 50 мл, 100 мл, 500 мл, 1000 мл.

**4.3 Мерные цилиндры,** объемом 100 мл, 1 000 мл.

**4.4 Градуированные пипетки,** объемом 5 мл и 10 мл.

**4.5 Магнитная мешалка или механический блендер.**

**4.6 Мембранные фильтры** 0,2 мкм, состоящие из ацетата целлюлозы или PVDF.

**4.7 Дилутор,** дополнительно для объемного разведения.

Если дериватизация делается нингидрином, используют его водный раствор в соотношении 1:20 по объему. Для ОРА дериватизации используют более высокое разведение. Регулярно проверяют коэффициент вариации (CV) разведения; CV должно быть меньше, чем 1 %.

**4.8 pH-метр.**

**4.9 Весы аналитические,** с точностью до 0,1 мг.

**4.10 Аминокислотный анализатор или аналогичное оборудование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).**

**4.10.1 Колонка с катионнообменной смолой.**

**4.10.2 Предколонка.**

**4.10.3 Автоматический или ручной инжектор** с объемом впрыскивания от 10 мкл до 100 мкл.

**4.10.4 ВЭЖХ насосы** для буферов.

**4.10.5 Нингидрин или ОРА постколоночный насос для дериватизации.**

**4.10.6 Канальный УФ-детектор,** установленный на 440 нм и 570 нм для постколоночного взаимодействия с нингидрином, или флуоресцентный детектор с длиной волны возбуждения 330 нм и длиной волны излучения 460 нм для постколоночного взаимодействия с ОРА.

**4.10.7 Система регистрации и обработки данных для интеграции пиков.**

## 5 Процедура

### 5.1 Подготовка проб

Пробу измельчают (в мельнице или ступке) до прохода через сито с отверстиями 0,25 мм. Тщательно перемешивают.

### 5.2 Количество подготовленных экстрактов

Приготовить два разных экстракта для каждой пробы.

### 5.3 Экстракции с использованием разведения путем взвешивания

#### 5.3.1 Чистые аминокислоты

Взвесьте от 0,45 г до 0,47 г лизина·HCl (3.2.1), от 0,29 г до 0,31 г треонина (3.2.2), от 0,36 г до 0,38 г метионина (3.2.3) во взвешенные 500 мл колбы. Добавьте примерно по 400 мл 0,1 моль/л HCl (3.10). Растворите аминокислоты при перемешивании с помощью магнитной мешалки (4.5) в течение 30 мин. Определите общую массу экстракционного раствора ( $m_{ex}$ ) и взвесьте аликвоту 1 мл с помощью градуированной пипетки (4.4) в мерную колбу 50 мл ( $m_{ali}$ ). Взвесьте дополнительно 2,5 мл раствора норлейцина (3.11.1) ( $m_{Nle}$ ) в ту же колбу, затем доведите до метки цитратным буфером (3.9) и хорошо перемешайте.

Если анализируемые растворы не могут быть проверены в тот же день, они должны храниться при температуре ниже 5 °C в течение не более 1 недели.

#### 5.3.2 Для премиксов и смешанных аминокислот

Рассчитывают примерную массу навески премикса,  $m_{тр\ премикс}$  в граммах, содержащего аминокислоту с низким ожидаемым значением, с помощью формулы (1):

$$m_{тр\ премикс} = \frac{m_{чистая\ aa}}{W_{exp}} \cdot 100, \tag{1}$$

где

$m_{чистая\ aa}$  — масса навески чистой аминокислоты, г;

$W_{exp}$  — ожидаемое значение массовой доли аминокислоты низкого содержания, выраженная в граммах на 100 г.

Например, для премикса с массовой долей DL-метионина 20 % требуется навеска в размере от 1,8 г до 1,9 г.

Взвесьте рассчитанные навески в предварительно взвешенные 500 мл колбы. Добавьте примерно по 400 мл 1 моль/л HCl. Растворите премикс при перемешивании с помощью магнитной мешалки в течение 30 мин. Определите общую массу экстракционного раствора ( $m_{ex}$ ) и взвесьте аликвоту 1 мл, используя градуированную пипетку (4.4), в 50 мл мерную колбу ( $m_{ali}$ ). Взвесьте дополнительно 2,5 мл раствора норлейцина (3.11.1) ( $m_{Nle}$ ) в ту же колбу. Доведите до метки цитратным буфером (3.9) и хорошо перемешайте.

Если премикс содержит аминокислоты с высоким ожидаемым значением, то можно готовить разведения, используя аликвоту менее 1 мл экстракта плюс 2,5 мл норлейцина (3.11.1) ( $m_{Nle}$ ). Если анализируемые растворы не могут быть проверены в тот же день, они должны храниться при температуре ниже 5 °C в течение не более 3 дней.



## 5.4 Экстракция с использованием объемного разведения

### 5.4.1 Чистые аминокислоты

Взвесьте от 0,45 г до 0,47 г лизина·HCl, от 0,29 г до 0,31 г треонина, от 0,36 г до 0,38 г метионина. Количественно перенесите с 0,1 моль/л HCl (3.10) в мерную колбу объемом 1 л. Растворите в примерно 900 мл 0,1 моль/л HCl при перемешивании с помощью магнитной мешалки (4.5) в течение 30 мин. Доведите до метки 0,1 моль/л HCl и хорошо перемешайте. Разбавьте и добавьте раствор норлейцина (3.11.1), следуя процедуре, указанной в 3.11.3.2, для подготовки градуировочного раствора.

Если анализируемые растворы не могут быть проверены в тот же день, они должны храниться при температуре ниже 5 °C в течение не более 3 дней.

### 5.4.2 Для премиксов и смешанных аминокислот

Рассчитайте примерную массу навески премикса,  $m_{\text{тр. премикс}}$  в граммах, содержащего аминокислоту с низким ожидаемым значением, как описано в разделе 5.3.2. Используйте для экстракции такие навески, чтобы гарантировать, что все области пиков аминокислот войдут в линейный диапазон градуировки. Взвесьте такое количество и количественно перенесите с 0,1 моль/л HCl (3.10) в мерную колбу объемом 1 л. Растворите примерно в 900 мл 0,1 моль/л HCl при перемешивании с помощью магнитной мешалки (4.5) в течение 30 мин. Доведите до метки 0,1 моль/л HCl и хорошо перемешайте. Разведите и добавьте раствор норлейцина (3.11.1), следуя процедуре, указанной в 3.11.3.2 для подготовка градуировочного раствора.

Если премикс содержит другие аминокислоты с высоким ожидаемым значением, то можно готовить разведения, используя аликвоту менее 1 мл экстракта плюс 2,5 мл норлейцина.

Если анализируемые растворы не могут быть проверены в тот же день, они должны храниться при температуре ниже 5 °C в течение не более 3 дней.

## 5.5 Хроматография

Фильтруют подходящий объем анализируемого раствора через мембранный фильтр (4.6) в виалу автосэмплера и впрыскивают внутрь анализатора или ВЭЖХ системы (4.10). Объем впрыскивания обычно составляет от 20 мл до 50 мл.

Хроматографическая система требуется для разделения аминокислот друг от друга и от других компонентов (например, аммония, аминов, пептидов или аминокислот).

Анализируемые аминокислоты должны быть отделены на 100 % до базовой линии от всех других полученных пиков, чтобы избежать ошибочных результатов, вызванных наложением пиков. Хроматографическая система должна обеспечивать линейную зависимость в диапазоне концентраций стандартной кривой.

## 6 Обработка результатов

### 6.1 Принцип метода и контроль градуировки

Содержание аминокислот в пробах определяют с использованием результатов первоначальных градуировочных растворов (3.11.3). Для того, чтобы убедиться в отсутствии дрейфа, следует вводить градуировочный раствор для контроля качества после каждого четырех определений. Если результаты этих определений не укладываются в диапазон от 99 % до 101 %, то анализ повторяют.

Чтобы определить площадь пика аминокислоты, сравнивают пики градуировочных растворов и анализируемых экстрактов и рассчитывают содержание аминокислоты как массовую долю в процентах от анализируемой навески, как указано в 6.2 или 6.3.

## 6.2 Расчет, если применяется весовое разведение

Рассчитывают коэффициент чувствительности ( $F_{Raa}$ ) для каждой аминокислоты, используя формулу (2):

$$F_{Raa} = \frac{A_{Nlec} \cdot m_{aa}}{A_{aac} \cdot m_{Nle}}, \quad (2)$$

где

- $A_{Nlec}$  пик области норлейцина в градуировочном растворе;
- $m_{aa}$  масса 2,5 мл основного раствора аминокислоты, выраженная в граммах (г);
- $A_{aac}$  пик области аминокислоты в градуировочном растворе;
- $m_{Nle}$  масса 2,5 мл внутреннего стандартного раствора норлейцина, выраженная в граммах (г).

Рассчитывают содержание аминокислоты в анализируемой пробе,  $w_{aa}$ , как массовую долю, выраженную в процентах, используя формулу (3):

$$w_{aa} = \frac{A_{aats} \cdot F_{Raa} \cdot \gamma_{aa} \cdot m_{Nlets} \cdot m_{ex}}{A_{Nlets} \cdot m_{tp} \cdot m_{ali} \cdot 10}, \quad (3)$$

где

- $A_{aats}$  пик области аминокислоты в анализируемом растворе;
- $A_{Nlets}$  пик области норлейцина в анализируемом растворе;
- $F_{Raa}$  коэффициент аминокислоты;
- $\gamma_{aa}$  концентрация аминокислоты в основном растворе (г/1000 г), предполагая, что 1 л раствора весит 1000 г;
- $m_{Nlets}$  масса 2,5 мл внутреннего стандартного раствора норлейцина в анализируемом растворе; выраженная в граммах (г);
- $m_{ex}$  масса общего раствора экстракта, выраженная в граммах (г);
- $m_{ali}$  масса используемой аликвоты экстракта, выраженная в граммах (г);
- $m_{tp}$  масса пробы, выраженная в граммах (г).

## 6.3 Расчет, если применяется объемное разведение

Рассчитывают коэффициент чувствительности ( $F_{Raa}$ ) для каждой аминокислоты с помощью формулы (4)

$$F_{Raa} = \frac{A_{Nlec}}{A_{aac}}, \quad (4)$$

где

- $A_{Nlec}$  пик области нейролицина в градуировочном растворе;
- $A_{aac}$  пик области аминокислоты в градуировочном растворе.