



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ  
РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ**  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ**  
**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ**  
**МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ**

119361 Москва, Озёрная ул., д. 46

E-mail: [analyt-vm@vniims.ru](mailto:analyt-vm@vniims.ru)

Тел. (495) 437 9419

Факс: (495) 437 5666

**СВИДЕТЕЛЬСТВО № 55-08**

**ОБ АТТЕСТАЦИИ МВИ**

**МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ**

**МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АМИНОКИСЛОТ:**

**АЛАНИНА, АРГИНИНА, АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ВАЛИНА,  
ГИСТИДИНА, ГЛИЦИНА, ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ИЗОЛЕЙЦИНА,  
ЛЕЙЦИНА, ЛИЗИНА, МЕТИОНИНА, ПРОЛИНА, СЕРИНА, ТИРОЗИНА,  
ТРЕОНИНА, ТРИПТОФАНА, ФЕНИЛАЛАНИНА, ЦИСТЕИНА – В ВОДНОМ  
РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Методика выполнения измерений массовой концентрации аминокислот: аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, валина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, пролина, серина, тирозина, треонина, триптофана, фенилаланина, цистеина – в водном растворе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, разработанная Лимнологическим институтом Сибирского отделения Российской Академии наук, аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563–96, ГОСТ Р ИСО 5725-2002.

Аттестация осуществлена по результатам экспертизы МВИ.

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает основными метрологическими характеристиками, приведенными на обороте настоящего свидетельства.

При реализации методики в лаборатории обеспечивают контроль стабильности результатов анализа на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения промежуточной прецизионности и показателя правильности.

Дата выдачи

11 апреля 2008 года

Заместитель директора



В.Н. Яншин

РЕЗУЛЬТАТЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ АТТЕСТАЦИИ

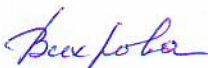
Аминокислоты	Диапазон измерений массовой концентрации, г/дм <sup>3</sup>	Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm\delta$ , % при $P=0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_R$ , %	Предел повторяемости, г, % $P=0,95$ , $n=2$
Аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, валин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, тирозин, треонин, триптофан, фенилаланин, цистеин	От 5,0 до 10 вкл.	15	5	7	14
	Св. 10 до 70 вкл.	10	3	4,5	8

Начальник сектора



О.Л. Рутенберг

Научный сотрудник



С.В. Вихрова

**МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ  
МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АМИНОКИСЛОТ:  
АЛАНИНА, АРГИНИНА, АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ВАЛИНА,  
ГИСТИДИНА, ГЛИЦИНА, ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ,  
ИЗОЛЕЙЦИНА, ЛЕЙЦИНА, ЛИЗИНА, МЕТИОНИНА, ПРОЛИНА,  
СЕРИНА, ТИРОЗИНА, ТРЕОНИНА, ТРИПТОФАНА,  
ФЕНИЛАЛАНИНА, ЦИСТЕИНА – В ВОДНОМ РАСТВОРЕ  
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ**

**ИРКУТСК  
2008**

1. Методика разработана Лимнологическим институтом Сибирского отделения  
Российской Академии наук

Директор  
Старший научный сотрудник

М.А. Грачев  
А.Л. Верещагин

2. Методика выполнения измерений аттестована Федеральным Государственным унитарным предприятием " Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы" (ФГУП "ВНИИМС"), Свидетельство об аттестации №55-08 от 11.04.2008, порядковый номер регистрации в Федеральном реестре методик выполнения измерений, применяемых в сферах распространения государственного метрологического контроля и надзора 04499, регистрационный код МВИ по Федеральному реестру ФР.1.31.2008.04499

Настоящая методика устанавливает процедуру выполнения измерений массовой концентрации наиболее распространенных (основных) аминокислот, приведенных в таблице 1, в водном растворе в диапазоне массовой концентрации от 5 до 70 г/дм<sup>3</sup> методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

## 1 Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значение погрешности (и её составляющих) результатов измерений не превышает значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Аминокислоты	Диапазон измерений массовой концентрации аминокислот, г/дм <sup>3</sup>	Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm \delta$ , % при $P=0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_R$ , %	Предел повторяемости, $r$ , % $P=0,95$ , $n=2$
Аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, валин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, пролин, серин, тирозин, треонин, триптофан, фенилаланин, цистеин	От 5,0 до 10 вкл.	15	5	7	14
	Св. 10 до 70 вкл.	10	3	4,5	8

## 2 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

### 2.1 Средства измерений

2.1.1 Хроматограф жидкостный "Милихром А-02" с колонкой хроматографической из нержавеющей стали, заполненной обращенно-фазовым сорбентом С18 по ТУ 25-7405.0040-95.

2.1.2 Весы аналитические лабораторные типа "Сарториус ВР 221S" с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-2001.

2.1.3 Ионномер универсальный (рН-метр) типа ЭВ-74 по ТУ 25-05-2147-78.

2.1.4 Пипетки градуированные 5-1-2-1; 5-2-2-10; 5-2-2-25 по ГОСТ 29227-91.

- 2.1.5 Пипетки с одной отметкой 1-2-50 по ГОСТ 29169-91.
- 2.1.6 Колбы мерные 2-25-2; 2-50-2; 2-100-2; 2-1000-2 по ГОСТ 1770-74.
- 2.1.7 Цилиндр мерный вместимостью 500 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.
- 2.1.8 Микрошприцы вместимостью 10 мм<sup>3</sup>, тип МШ 10М по ТУ 6-80 5Е.833.106.
- 2.1.9 Микрошприцы вместимостью 50 мм<sup>3</sup>, тип МШ 50М по ТУ 6-80 5Е.833.104.
- 2.1.10 Микрошприцы вместимостью 250 мм<sup>3</sup> - вместо пипеток на 200 мкл, которых нет в ГОСТ

## 2.2 Вспомогательные устройства и материалы

- 2.2.1 Шкаф сушильный СНОЛ по ГОСТ 13474 – 79.
- 2.2.2 Насос вакуумный ЗНВР-1Д- по ГОСТ-14707-77.
- 2.2.3 Термостат водяной с вместимостью бани не менее 4,5 дм<sup>3</sup>, тип ТW-2 (Латвия).
- 2.2.4 Дистиллятор, тип ДЗ-4-2М по ТУ 64-1-721-79.
- 2.2.5 Колбы конические с шлифованной пробкой вместимостью 10 см<sup>3</sup>, 10 шт. ГОСТ 25336-82.
- 2.2.6 Химические стаканы вместимостью 1000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- 2.2.7 Фильтр пористый стеклянный, пористость 100.
- 2.2.8 Пробирки полипропиленовые микроцентрифужные вместимостью 1,5 см<sup>3</sup> (Greiner Bio-One GmbH, Германия).
- 2.2.9 Мембраны фильтровальные пористостью 0,45 мкм, тип НА, (Millipore Corporation, США).

## 2.3 Реактивы и материалы

- 2.3.1 Аминокислоты (SIGMA-ALDRICH Co., США) с содержанием основного вещества  $\geq 97\%$

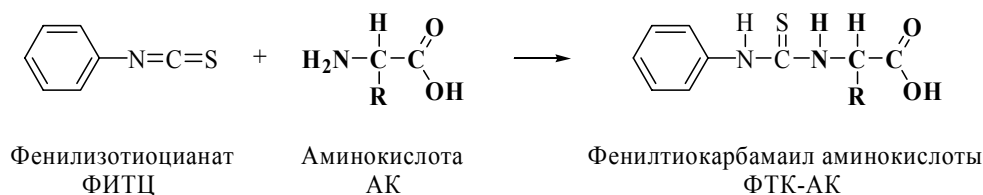
	Номер по каталогу
2.3.1.1 Аланин (Ала)	А 7502
2.3.1.2 Аргинин моногидрохлорид (Арг)	А 5131
2.3.1.3 Аспарагиновая кислота (Асп)	А 9006
2.3.1.4 Валин (Вал)	V 0375
2.3.1.5 Гистидин моногидрохлорид моногидрат (Гис)	H 8125
2.3.1.6 Глицин (Гли)	G 7403
2.3.1.7 Глутаминовая кислота (Глу)	G 8415
2.3.1.8 Изолейцин (Илей)	298689
2.3.1.9 Лейцин (Лей)	L 7875
2.3.1.10 Лизин моногидрохлорид (Лиз)	L 5626
2.3.1.11 Метионин (Мет)	M 9500
2.3.1.12 Пролин (Про)	P 5607
2.3.1.13 Серин (Сер)	S 4375
2.3.1.14 Тирозин (Тир)	145726
2.3.1.15 Треонин (Тре)	T 8375
2.3.1.16 Триптофан (Трп)	T 3300
2.3.1.17 Фенилаланин (Фен)	147966
2.3.1.18 Цистеин гидрохлорид (Цис)	C 1276
2.3.2 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.	
2.3.3 Кислота соляная, стандарт-титр ТУ 6-09-2540-72.	
2.3.4 Калий двуххромовокислый, квалификации "ч." по ГОСТ 4220-75.	
2.3.5 Триэтиламин (ТЭА) по ТУ 6-09-1496-77.	
2.3.6 Нингидрин по ТУ 6-09-10-1384-79.	

- 2.3.7 Фенилизотиоцианат по ТУ 6-09-1211-76.  
 2.3.8 Кислота ортофосфорная, квалификации "х.ч." по ГОСТ 6552-80.  
 2.3.9 Кислота серная ( $\rho=1,84$  кг/л), квалификации "х.ч. L 5626" по ГОСТ 4204-77.  
 2.3.10 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии квалификации "ос.ч." по ТУ 6-09-14-2167-84.  
 2.3.11 Аммоний уксуснокислый, квалификации "х.ч." по ГОСТ 3117-78.  
 2.3.12 Муравьиная кислота, квалификации "х.ч." по ГОСТ 5848-73.  
 2.3.13 Перекись водорода по ГОСТ 10929-76.  
 2.3.14 Аргон газообразный по ГОСТ-10157-79.

*Примечание: допускается применение других средств измерений, вспомогательных устройств, реактивов и материалов с метрологическими и техническими характеристиками не хуже приведенных выше.*

### 3 Метод измерений

Измерения выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке с обращенной фазой и с УФ-детектированием фенилтиокарбамаильных производных аминокислот (ФТК-АК) на длинах волн 246 нм и 260 нм. Суть метода заключается в том, что предварительно в щелочном растворе, содержащем триэтиламин, под действием фенилизотиоцианата (ФИТЦ) происходит превращение (derivatизация) аминокислот в их производные, пригодные для хроматографического разделения и детектирования [Б.1-Б.3]. Схематически процесс derivatизации может быть выражен следующим образом:



Далее полученную смесь производных аминокислот вводят в колонку с обращенно-фазовым сорбентом и, элюируя растворами с разными составами и значениями  $pH$  в градиентном режиме, разделяют сначала первые 9 аминокислот (Асп, Глу, Сер, Гли, Гис, Тре, Ала, Арг, Про), а затем, в другом градиентном режиме, остальные. Примеры хроматограмм приведены на рис. 1, 2 и 3.

Цистеин определяют отдельно от остальных аминокислот. Для этого аликвотную часть анализируемого раствора перед derivatизацией обрабатывают надмуравьиной кислотой, образующейся прямо в реакционной смеси при смешивании перекиси водорода и муравьиной кислоты. При этом происходит окисление цистеина до цистеиновой кислоты [Б.4, Б.5] (ЦисК), которую затем анализируют, как все другие аминокислоты, в виде ФТК-АК.

Перед выполнением измерений хроматограф градуируют по градуировочным растворам, приготовленным из сухих аминокислот по (7.4.8 – 7.5.3), для установления зависимости между концентрациями определяемых аминокислот и площадями их пиков при  $\lambda=260$  нм. При проведении измерений полученные градуировочные зависимости используют для расчета массовой концентрации аминокислот по площадям их пиков на хроматограммах анализируемых образцов. Если существуют предварительные данные об аминокислотном составе анализируемых образцов, то градуировку можно проводить по двум-трем градуировочным растворам с концентрациями аминокислот, близкими к предполагаемым.

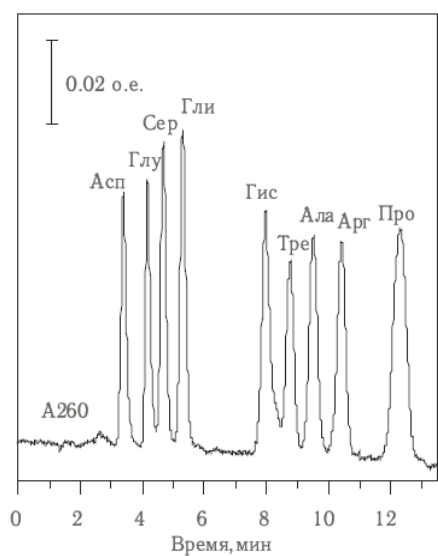


Рисунок 1. Хроматограмма смеси первых ФТК-АК по п. 3.

Объем пробы 2 мм<sup>3</sup>, концентрации аминокислот по 0,0002 моль/дм<sup>3</sup>.

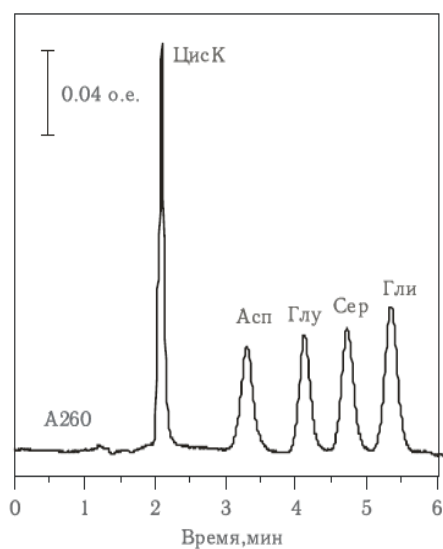


Рисунок 2. Хроматограмма смеси первых ФТК-АК и ФТК цистеиновой кислоты по п. 3.

Объем пробы 2 мм<sup>3</sup>, концентрации аминокислот по 0,0002 моль/дм<sup>3</sup>.

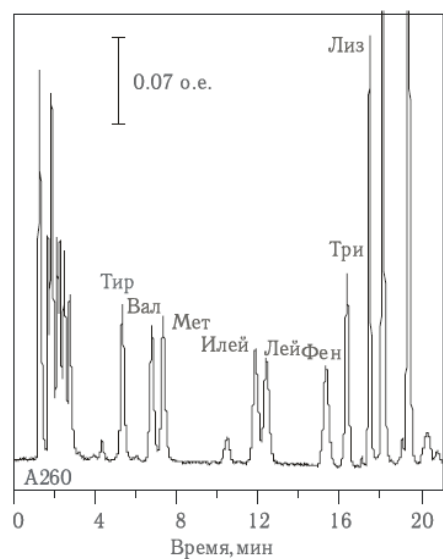


Рисунок 3. Хроматограмма смеси последних девяти ФТК-АК по п. 3.

Объем пробы 2 мм<sup>3</sup>, концентрации аминокислот по 0,0002 моль/дм<sup>3</sup>.



#### 4 Требования безопасности

При выполнении измерений соблюдают следующие требования безопасности.

4.1 При работе с реактивами соблюдают требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76.

4.2 При выполнении измерений соблюдают требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79.

4.3 При проведении измерений соблюдают требования пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и должны быть в наличии средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

4.4 Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005-88.

4.5 Организация обучения работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90.

#### 5 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-химика, навыки и опыт работы в химической лаборатории, прошедших обучение хроматографическим методам анализа, стажировку на хроматографе "Милюхроме А-02" и изучивших настоящую методику.

#### 6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура воздуха от 18°C до 25°C;
- атмосферное давление 84-107 кПа (630-800 мм рт.ст.);
- относительная влажность воздуха от 30% до 80%;
- напряжение переменного тока,  
питающего хроматограф  $(220 \pm_{33}^{22})$  В;
- частота тока  $(50 \pm 1)$  Гц;
- отсутствие попадания прямого солнечного света на хроматограф.

#### 7 Подготовка к выполнению измерений

7.1 Перед выполнением измерений по настоящей методике проводят следующие работы: подготовку (очистку) посуды, растворителей и реактивов; приготовление растворов; приготовление градуировочных растворов.

##### 7.2 Подготовка посуды

Используемую при анализе посуду тщательно моют хромовой смесью, последовательно ополаскивают водопроводной и дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре (120-150)°С.

##### 7.3 Подготовка реактивов

7.3.1 Дистиллированную воду, используемую для приготовления элюентов, пропускают через колонку, наполненную обращенно-фазовым сорбентом. Далее по тексту обработанная таким образом вода упоминается как очищенная вода.

7.3.2 Триэтиламин перегоняют над нингидрином с дефлегматором и хранят в плотно закрывающемся сосуде под слоем аргона при температуре минус 5°C.

7.3.3 Фенилизотиоцианат перегоняют в вакууме с дефлегматором и хранят в плотно закрывающемся сосуде под слоем аргона при температуре минус 5°C.

#### 7.4 Приготовление растворов

7.4.1 Приготовление водного раствора уксуснокислого аммония с молярной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> (для приготовления элюента "А", раствор №1)

Навеску 77,08 г уксуснокислого аммония растворяют в стеклянном стакане в (750-800) см<sup>3</sup> очищенной воды, доводят значение *pH* раствора до 5,25 добавлением концентрированной ортофосфорной кислоты, количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup> и доводят объем раствора очищенной водой до метки. Полученный раствор фильтруют через мембрану с размером пор 0,45 мкм и хранят в плотно закрывающемся сосуде при температуре плюс 5°C.

7.4.2 Приготовление водного раствора уксуснокислого аммония с молярной концентрацией 2 моль/дм<sup>3</sup> (для приготовления элюента "Б", раствор №2)

Навеску 154,16 г уксуснокислого аммония растворяют в стакане в (750-800) см<sup>3</sup> очищенной воды, доводят значение *pH* раствора до 6,50 добавлением концентрированной ортофосфорной кислоты, количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup> и доводят объем раствора очищенной водой до метки. Полученный раствор фильтруют через мембрану с размером пор 0,45 мкм и хранят в плотно закрывающемся сосуде при температуре плюс 5°C.

7.4.3 Приготовление элюента "А" (раствор №3)

Пипеткой вместимостью 50 см<sup>3</sup> переносят 50 см<sup>3</sup> раствора №1 в мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup> и доводят объем раствора очищенной водой до метки.

7.4.4 Приготовление элюента "Б" (раствор №4)

Пипеткой вместимостью 50 см<sup>3</sup> переносят 50 см<sup>3</sup> раствора №2 в мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup>, мерным цилиндром добавляют 350 см<sup>3</sup> ацетонитрила и доводят объем раствора очищенной водой до метки.

7.4.5 Приготовление раствора для проведения дериватизации (раствор №5)

Градуированными пипетками в плотно закрывающуюся колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup> помещают 5 см<sup>3</sup> ацетонитрила, 2 см<sup>3</sup> триэтиламина и 3 см<sup>3</sup> очищенной воды. Тщательно перемешивают.

7.4.6 Приготовление раствора для перерастворения ФТК-АК (раствор №6)

Градуированными пипетками в плотно закрывающуюся колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup> помещают 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила и 9 см<sup>3</sup> раствора №3. Тщательно перемешивают.

7.4.7 Приготовление раствора соляной кислоты с молярной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (раствор №7 для приготовления растворов индивидуальных аминокислот, основного раствора и градуировочных растворов аминокислот)

Раствор готовят из стандарт-титра соляной кислоты разбавлением в мерной колбе вместимостью 1 дм<sup>3</sup>.

7.4.8 Приготовление растворов индивидуальных аминокислот (растворы аминокислот, за исключением тирозина, с молярной концентрацией 0,05 моль/дм<sup>3</sup> для приготовления градуировочного раствора №1)

Точные навески аминокислот по таблице 2 помещают в конические колбы вместимостью 10 см<sup>3</sup> и растворяют в 5 см<sup>3</sup> раствора №7, отмеренного градуированной пипеткой.

Таблица 2

№	Аминокислота	Навеска, мг
1	Аланин	22,3
2	Аргинин	52,7
3	Аспарагиновая кислота	33,3
4	Валин	29,3
5	Гистидин	52,4
6	Глицин	18,8
7	Глутаминовая кислота	36,8
8	Изолейцин	32,8
9	Лейцин	32,8
10	Лизин	45,7
11	Метионин	37,3
12	Пролин	28,8
13	Серин	26,3
14	Тирозин*	4,5
15	Треонин	29,8
16	Триптофан	51,1
17	Фенилаланин	41,3
18	Цистеин	39,4

\* В связи с плохой растворимостью тирозина, его раствор готовят с молярной концентрацией  $0,0025 \text{ моль/дм}^3$ , добавляют его в количестве 4,5 мг в градуировочный раствор №1 по 7.5.1.

#### 7.5 Приготовление градуировочных растворов

7.5.1 Приготовление градуировочного раствора №1 (основной раствор аминокислот с молярной концентрацией  $2,5 \text{ ммоль/дм}^3$  каждой аминокислоты для приготовления градуировочных растворов №№2, 3)

Точную навеску тирозина 4,5 мг помещают в коническую колбу вместимостью  $10 \text{ см}^3$  и градуированными пипетками добавляют по  $0,5 \text{ см}^3$  раствора каждой аминокислоты по 7.4.8 и  $1,5 \text{ см}^3$  раствора №7. Тщательно перемешивают.

#### 7.5.2 Приготовление градуировочного раствора №2

Градуированной пипеткой вместимостью  $1 \text{ см}^3$  помещают  $0,5 \text{ см}^3$  градуировочного раствора №1 в полипропиленовую пробирку и добавляют туда градуированной пипеткой  $0,5 \text{ см}^3$  раствора №7.

#### 7.5.3 Приготовление градуировочного раствора №3

Градуированной пипеткой вместимостью  $1 \text{ см}^3$  помещают  $0,2 \text{ см}^3$  градуировочного раствора №1 в полипропиленовую пробирку и добавляют туда градуированной пипеткой  $0,6 \text{ см}^3$  раствора №7.

Растворы №№1; 2; 3; 4; 5; 6 и градуировочные растворы хранят в закрытых емкостях при температуре плюс  $5^\circ\text{C}$  не более 2 месяцев. Для остальных растворов условия и сроки хранения не нормируются.

#### 7.6 Градуировка хроматографа

7.6.1 Хроматограф готовят в соответствии с руководством по его эксплуатации.

7.6.2 Градуировочную характеристику устанавливают по трем сериям градуировочных растворов, каждый из которых измеряют три раза (градуировочные растворы №№ 1-3). Каж-

дую серию градуировочных растворов готовят, выполняя последовательно все операции по 7.4.8. - 7.5.3.

Градуировочные растворы хроматографируют по разделу 8 (порядок расположения пиков на хроматограммах показан на рис.1, 2, 3). Хроматограммы обрабатывают с помощью прилагаемого к хроматографу программного обеспечения.

Определяют зависимость между массовой концентрацией аминокислот, выраженной в г/дм<sup>3</sup>, и соответствующими площадями пиков при  $\lambda=260$  нм. Таблица массовых концентраций аминокислот в градуировочных растворах, выраженных в г/дм<sup>3</sup>, приводится в приложении А.

Полученные значения площадей пиков и соответствующих им концентраций обрабатывают по методу наименьших квадратов [Б.6 ???] и получают уравнения градуировочных зависимостей в виде

$$S_i = A_i + B_i \cdot C_i, \quad (1)$$

где  $S_i$ - площадь пика  $i$ -той аминокислоты (в форме ФТК-производного), е.о.п.·мм<sup>3</sup>;  
 $C_i$ - массовая концентрация  $i$ -той аминокислоты в градуировочном растворе, г/дм<sup>3</sup>;  
 $A_i, B_i$  - коэффициенты регрессии.

Рассчитывают доверительные интервалы для коэффициентов регрессии.

Рассчитывают коэффициент корреляции  $r$  полученной зависимости. Если  $r < 0,92$ , то выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, устраняют их и повторяют градуировку.

Градуировку хроматографа проводят после выполнения серии из 50 анализов, не реже 1 раза в неделю.

#### 7.7 Подготовка анализируемых растворов

7.7.1 Перед выполнением измерений анализируемый раствор фильтруют через воронку с пористым фильтром для удаления механических примесей.

7.7.2 Для приблизительной оценки массовой концентрации аминокислот градуированной пипеткой помещают 2,5 см<sup>3</sup> анализируемого раствора в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> и доводят объем раствора до метки раствором №7.

7.7.3 Непосредственно перед хроматографированием, для определения массовой концентрации основных аминокислот, за исключением цистеина, выполняют следующую обработку анализируемого раствора.

7.7.3.1 Микрошприцем помещают 10 мкл анализируемого раствора в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 см<sup>3</sup> и упаривают досуха в вакууме при температуре 25°С (водяная баня термостата). Добавляют микрошприцем в пробирку 30 мм<sup>3</sup> раствора №5 и упаривают досуха в вакууме при температуре 25°С. Добавляют микрошприцем в ту же пробирку 20 мм<sup>3</sup> раствора №5 и 2 мм<sup>3</sup> ФИТЦ, перемешивают и выдерживают 20 мин при температуре 25°С. Для удаления из реакционной смеси растворителей и остатков ФИТЦ пробирку выдерживают 20 мин в вакууме при температуре 25°С. Растворяют сухой остаток в 125 мм<sup>3</sup> раствора №6, перемешивают встряхиванием.

7.7.3.2 Для определения цистеина 10 мм<sup>3</sup> исследуемого раствора помещают в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 см<sup>3</sup> и упаривают досуха в вакууме при температуре 25 С. Растворяют содержимое в 10 мм<sup>3</sup> муравьиной кислоты, встряхивая в течение 1 мин, и добавляют 2 мм<sup>3</sup> концентрированной перекиси водорода. Выдерживают 25 минут при температуре 25 С, добавляют 10 мм<sup>3</sup> воды и упаривают досуха в вакууме при температуре 25 С (за 10 мин). Далее выполняют дериватизацию по 7.7.3.1, растворяя на последнем этапе сухой остаток в смеси 120 мм<sup>3</sup> раствора №6 и 5 мм<sup>3</sup> ТЭА.

## 8 Выполнение измерений

8.1 Градуировку хроматографа и измерения проводят при следующих условиях:

Элюент в насосе "А" хроматографа	Раствор №3
Элюент в насосе "Б" хроматографа	Раствор №4
Длина волны детектора	246 нм и 260 нм
Расход элюента	200 мкл/мин
Температура термостата колонки	50°C.

8.2 Хроматографирование градуировочных и анализируемых растворов

8.2.1 Дозируя автосамплером хроматографа, хроматографируют 2 мм<sup>3</sup> градуировочного раствора, приготовленного по 7.5 и деривати-зированного по 7.7.3.1 или 7.7.3.2, или анализируемого раствора, полученного по 7.7.2. или 8.3.1. и дериватизированного по 7.7.3.1 или 7.7.3.2.

8.2.1.1 Для определения первых 9 аминокислот (раздел 3) хроматографирование выполняют при градиентном элюировании с параметрами, приведенными в таблице 3.

Таблица 3

Степень градиента	Объем ступени, мм <sup>3</sup>	Объемная доля элюента "Б", %
Регенерация	650	4
0 - 1	2500	От 4 до 12
1 - 2	0	От 12 до 100
2 - 3	2100	100

8.2.1.2 Для определения цистеина (раздел 3) записывают хроматограмму 2 мм<sup>3</sup> раствора, полученного по 7.7.3.2., в условиях по 8.2.1.1.

8.2.1.3 Для определения остальных аминокислот (раздел 3), повторно дозируя автосамплером хроматографа, хроматографируют 2 мм<sup>3</sup> раствора, полученного по 7.7.3.1. Хроматографирование выполняют при градиентном элюировании с параметрами, приведенными в таблице 4.

Таблица 4

Степень градиента	Объем ступени, мм <sup>3</sup>	Объемная доля элюента "Б", %
Регенерация	650	30
0 - 1	2700	От 30 до 47
1 - 2	450	От 47 до 100
2 - 3	1050	100

8.3 На полученных хроматограммах идентифицируют пики ФТК-производных аминокислот по временам удерживания и спектральным отношениям  $R_i = S_{i\ 260}/S_{i\ 246}$ , сравнивая с временами удерживания и спектральными отношениями на хроматограмме градуировочного раствора. Относительная разность времен удерживания для соответствующих пиков не должна превышать  $\pm 3\%$ . Ориентировочные значения и допустимые отклонения  $R_i$  приведены в приложении А.

8.3.1 С помощью градуировочной зависимости при  $\lambda=260$  нм, используя прилагаемое к хроматографу программное обеспечение, по хроматограммам раствора, приготовленного

по 7.7.2, приближенно оценивают массовую концентрацию основных аминокислот в анализируемом растворе, с учетом разбавления по 7.7.2. Затем, для точного определения массовой концентрации, по табл. 5 определяют необходимое разбавление анализируемого раствора. С помощью градуированной пипетки и мерной колбы производят разбавление. Для этого указанный в табл. 5 объем анализируемой пробы градуированной пипеткой вместимостью 1 см<sup>3</sup> помещают в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> и доводят объем раствора раствором №7 до метки. Раствор, разбавленный соответствующим образом, хроматографируют по 8.2. Каждую хроматограмму записывают дважды.

Таблица 5

Диапазон измерений массовой концентрации аминокислот, г/дм <sup>3</sup>	Коэффициент разбавления	Объем анализируемой пробы, см <sup>3</sup>
От 70 до 30 вкл.	200	0,125
От 30 до 10 вкл.	100	0,25
От 10 до 5 вкл.	30	0,83

## 9. Обработка результатов измерений

9.1 Массовую концентрацию аминокислот в пробе рассчитывают по полученным градуировочным зависимостям, результат умножают на коэффициент разбавления (табл. 5).

9.2 За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (2)

$$\frac{2 \cdot |C_{i1} - C_{i2}| \cdot 100}{(C_{i1} + C_{i2})} \leq r_i, \quad (2)$$

где  $C_{i1}$ ,  $C_{i2}$  – результаты параллельных определений массовой концентрации  $i$ -той аминокислоты в водном растворе, г/дм<sup>3</sup>;

$r_i$  – значение предела повторяемости  $i$ -той аминокислоты (таблица 1), %.

9.3 Если условие (2) не выполняется, получают еще два результата в полном соответствии с данной МВИ. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов четырех определений, если выполняется условие (3)

$$\frac{4 \cdot |C_{i\max} - C_{i\min}| \cdot 100}{(C_{i1} + C_{i2} + C_{i3} + C_{i4})} \leq CR_{i0,95}, \quad (3)$$

где  $C_{i\max}$ ,  $C_{i\min}$  – максимальное и минимальное значения из полученных четырех результатов параллельных определений массовой концентрации  $i$ -той аминокислоты в водном растворе, г/дм<sup>3</sup>;

$CR_{i0,95}$  – значение критического диапазона для уровня вероятности при  $P=0,95$  и  $n$  – числе результатов определений.

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r$$

Для  $n=4$

$$CR_{i0,95} = 3,6 \cdot \sigma_{ir}, \quad (4)$$

где  $\sigma_{ir}$  – показатель повторяемости  $i$ -той аминокислоты (таблица 1), %.

Если условие (3) не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики.

9.4 Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$\bar{C}_i \pm 0,01 \cdot \delta_i \cdot \bar{C}_i, \text{ при } P=0,95,$$

где  $\bar{C}_i$  – среднее арифметическое значение результатов  $n$  определений  $i$ -той аминокислоты, признанных приемлемыми по 9.2, 9.3, г/дм<sup>3</sup>.

$\pm \delta_i$  – границы относительной погрешности измерений  $i$ -той аминокислоты, % (таблица 1).

В случае если массовая концентрация аминокислоты ниже нижней (выше верхней) границы диапазона измерений, производят следующую запись в журнале: "массовая концентрация \_\_\_\_\_ менее 5 г/дм<sup>3</sup> (более 70 г/дм<sup>3</sup>)".

## **10 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории**

Контроль качества результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002, используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности по 6.2.3 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 и показателя правильности по 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории. Рекомендуется устанавливать контролируемый период таким образом, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют качество работы оператора.

**Приложение А**  
(обязательное)

**Массовая концентрация аминокислот в градуировочных растворах**  
(в пересчете на свободные аминокислоты)  
**и ориентировочные значения спектральных отношений ФТК-АК.**

№	Аминокислота	$S_{260}/S_{246}$	Массовая концентрация, г/дм <sup>3</sup>		
			Градуировочный раствор №1 с молярной концентрацией 0,0025 моль/дм <sup>3</sup>	Градуировочный раствор №2 с молярной концентрацией 0,00125 моль/дм <sup>3</sup>	Градуировочный раствор №3 с молярной концентрацией 0,00062 моль/дм <sup>3</sup>
1	Аланин	0,77	0,223	0,111	0,055
2	Аргинин	0,77	0,436	0,218	0,108
3	Аспарагиновая к-та	0,74	0,333	0,166	0,083
4	Валин	0,79	0,293	0,146	0,073
5	Гистидин	0,71	0,388	0,194	0,096
6	Глицин	0,76	0,188	0,094	0,047
7	Глутаминовая к-та	0,80	0,368	0,184	0,091
8	Изолейцин	0,81	0,328	0,164	0,081
9	Лейцин	0,80	0,328	0,164	0,081
10	Лизин	0,84	0,366	0,183	0,091
11	Метионин	0,79	0,373	0,187	0,093
12	Пролин	0,55	0,288	0,144	0,071
13	Серин	0,78	0,263	0,131	0,065
14	Тирозин	0,84	0,453	0,227	0,112
15	Треонин	0,74	0,298	0,149	0,074
16	Триптофан	1,01	0,511	0,255	0,127
17	Фенилаланин	0,86	0,413	0,207	0,102
18	Цистеин	0,70	0,303	0,152	0,075

*Примечание: значения спектральных отношений, полученные на другом хроматографе, могут отличаться от приведенных в таблице из-за погрешности настройки детектора. Предел абсолютной погрешности приведенных спектральных отношений составляет  $\pm 0,03$ .*



**Приложение Б**  
(обязательное)

- Б.1 *M.M.T.O`Hare, O.Tortora et al.* // J. Chromatogr. 1987. V. 389. P. 379.  
Б.2 *R.F. Ebert* // Analyt. Biochem. 1986. V. 154. P. 431.  
Б.3 *C.Y.Yang, F.I. Sepulveda* // J. Chromatogr. 1985. V. 346. P. 413.  
Б.4 *F.Sanger* // Biochem. Journ. 1949. V. 44. P. 126.  
Б.5 *C.H.W. Hirs* // J. Biol. Chem. 1956. V. 219. P. 611.  
Б.6 *Булатов М.И., Калинин И.П.* Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Ленинград: Химия, 1986. 431 с.  
Б.7 *Воскресенский П.И.* Техника лабораторных работ. М: Химия, 1973. 717 с.