



СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации МВИ

№ 02-2002

Методика выполнения измерений массовой концентрации аминокислот в водном растворе, разработанная Лимнологическим институтом СО РАН и представленная в рекомендации «ГСИ. МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ. МВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ», аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96. Аттестация проведена по результатам метрологической экспертизы названного документа и анализа погрешностей измерений.

В результате экспертизы установлено, что методика соответствует предъявляемым к ней требованиям и обладает следующими метрологическими характеристиками:

- Объект измерения - водные растворы аминокислот;
- Измеряемая величина - массовые концентрации 18-ти основных аминокислот: аланина, аргинина, аспаргиновой кислоты, валина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, пролина, серина, тирозина, треонина, триптофана, фенилаланина, цистеина;
- Диапазон измерения массовых концентраций аминокислот - от 5 до 70 г/л;
- Относительная погрешность измерений массовой концентрации – не более $\pm 15\%$

Аттестованная методика выполнения измерений может использоваться в сферах, подлежащих государственному метрологическому контролю и надзору.

Директор ВС НИИТФТРИ

О.И.Гудков

Главный метролог

И.А.Соков



20.06.02.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ



РЕКОМЕНДАЦИЯ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СИСТЕМА ОБЕСПЕЧЕНИЯ
ЕДИНСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ
В ВОДНОМ РАСТВОРЕ
МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

МВИ № 02-2002

Зав. отделом

Г.И. Барам
“20” июня 2002 г.

Ст. научн. сотрудник

А.Л. Верещагин
“20” июня 2002 г.

Научн. сотрудник

И.Н. Азарова
“20” июня 2002 г.

ИРКУТСК

2002

1 РАЗРАБОТАНА

Лимнологическим институтом Сибирского отделения Российской Академии наук

Директор	М.А.Грачев
Зав. отделом	Г.И.Барам
Ст. научн. сотрудник	А.Л.Верещагин
Научн. сотрудник	И.Н.Азарова

2 АТТЕСТОВАНА

Восточно-Сибирским научно-исследовательским институтом физико-технических и радиотехнических измерений. Свидетельство об аттестации № 02-2002 от 20.06.2002

3 ЗАРЕГИСТРИРОВАНА

Настоящая рекомендация устанавливает методику выполнения измерений массовой концентрации наиболее распространенных (основных) аминокислот (табл.1) в водном растворе в диапазоне 5 - 70 г/л методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Перечень определяемых аминокислот приведен в таблице 1.

Таблица 1

№	Определяемая аминокислота	№	Определяемая аминокислота
1	Аланин (Ала)	10	Лизин (Лиз)
2	Аргинин (Арг)	11	Метионин (Мет)
3	Аспарагиновая кислота (Асп)	12	Пролин (Про)
4	Валин (Вал)	13	Серин (Сер)
5	Гистидин (Гис)	14	Тирозин (Тир)
6	Глицин (Гли)	15	Треонин (Тре)
7	Глутаминовая кислота (Глу)	16	Триптофан (Трп)
8	Изолейцин (Илей)	17	Фенилаланин (Фен)
9	Лейцин (Лей)	18	Цистеин (Цис)

1. Нормы погрешности измерений

1.1. Пределы допускаемой относительной погрешности измерений массовой концентрации для всех аминокислот составляют $\pm 15\%$.

2. Средства измерений, реактивы и материалы

2.1. Средства измерений

Хроматограф жидкостный "Милихром А-02" с колонкой хроматографической из нержавеющей стали, заполненной обращеннофазным сорбентом С18

ТУ 25-7405.0040-95

Аминокислоты производства SIGMA-ALDRICH Chemie, Германия, содержание основного вещества 98%.

Номер по каталогу SIGMA, 1999

Аланин (Ала)	A 7502
Аргинин (Арг)	A 5131
Аспарагиновая кислота (Асп)	A 9006
Валин (Вал)	V 0375
Гистидин (Гис)	H 8125
Глицин (Гли)	G 7403
Глутаминовая кислота (Глу)	G 6904
Изолейцин (Илей)	I 7268
Лейцин (Лей)	L 5652
Лизин (Лиз)	L 5626
Метионин (Мет)	M 9500
Пролин (Про)	P 8449
Серин (Сер)	S 4375
Тирозин (Тир)	T 8909
Треонин (Тре)	T 8375
Триптофан (Трп)	T 3300
Фенилаланин (Фен)	P 1876
Цистеин (Цис)	C 1276

Лабораторные весы Сарториус ВР221S, класс точности 1

ГОСТ 24104-88.

Иономер универсальный (рН-метр) типа ЭВ-74

ТУ 25-05-2147-78.

Пипетки градуированные 5-1-1; 5-1-5; 5-2-10; 5-2-25

ГОСТ 20292-74.

Пипетки градуированные объемом 0,2 мл 2кл

ГОСТ 20292-74

Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-1000-2

ГОСТ 1770-74.

Цилиндр мерный емкостью 500 мл	ГОСТ 1770-74
Микрошприцы объемом 10 мкл, тип МШ 10М	ТУ6-80 5Е.833.106.ТУ
Микрошприцы объемом 50 мкл, тип МШ 50М	ТУ6-80 5Е.833.104.ТУ

2.2 Вспомогательные устройства и посуда

Шкаф сушильный СНОЛ	ГОСТ 13474-79.
Насос вакуумный ЗНВР-1Д-	ГОСТ-14707-77
Термостат с емкостью бани не менее 5 л, тип U-10, Германия	
Дистиллятор, тип ДЗ-4-2М	ТУ 64-1-721-79
Колбы конические с пришлифованной пробкой вместимостью 10 мл	ГОСТ 25336-82
Фильтр пористый стеклянный, пористость 100	
Пробирки полипропиленовые объемом 1,5 мл одноразовые, 000-MICR-150, Elkaу, Швеция	
Мембраны фильтровальные пористостью 0,45 мкм, тип <i>HA</i> , производства Millipore, США	
Химические стаканы емкостью 1000 мл	ГОСТ 25336-82.

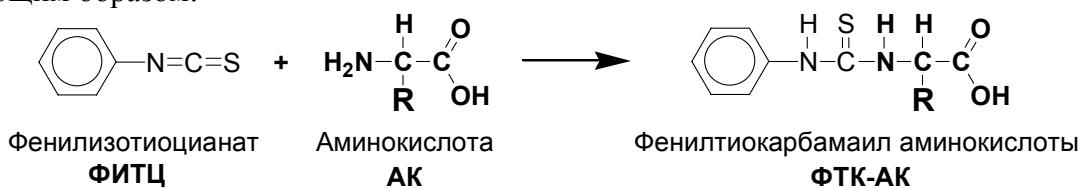
2.3 Реактивы и материалы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72.
Кислота соляная стандарт-титр	ТУ 6-09-2540-72
Калий двухромовокислый, "ч"	ГОСТ 4220-75
Триэтиламин (ТЭА)	ТУ 6-09-1496-77
Нингидрин	ТУ 6-09-10-1384-79
Фенилизотиоцианат	ТУ 6-09-1211-76
Кислота ортофосфорная, "хч"	ГОСТ 6552-80
Кислота серная ($\rho=1,84$ кг/л), "хч"	ГОСТ 4204-77.
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "сорт 0 или 1"	"Криохром", С.-Петербург
Аммоний уксуснокислый, "хч"	ГОСТ 3117-78
Муравьиная кислота, "хч"	ГОСТ 5848-73
Перекись водорода	ГОСТ 10929-76
Аргон газообразный	ГОСТ-10157-79

Примечание: Допускается использование средств измерений, оборудования и материалов, отличающихся от указанных в перечне, но не уступающих им по характеристикам.

3. Метод измерения.

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 преварительно в щелочном растворе, содержащем триэтиламин, под действием фенилизотиоцианата (ФИТЦ) происходит превращение (дериватизация) аминокислот в их производные, пригодные для хроматографического разделения и детектирования [1-3]. Схематически процесс дериватизации может быть выражен следующим образом:



Далее полученную смесь производных аминокислот вносят в колонку с обращеннофазным 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 дериватизацией обрабатывают надмуравьиной кислотой, образующейся прямо в реакционной смеси при смешивании перекиси водорода и муравьиной кислоты. При этом происходит окисление цистеина до цистеиновой кислоты [4,5] (ЦисК), которую затем анализируют, как все другие аминокислоты, в виде ФТК-АК.

Перед выполнением измерений хроматограф градуируют по аттестованным смесям, приготовленным из сухих аминокислот по п.7.4.8. – 7.5.3., для установления зависимости между концентрациями определяемых аминокислот и площадями их пиков при λ 260 нм. При проведении измерений полученные градуировочные характеристики используют для расчета массовых концентраций 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 аттестованным смесям с концентрациями аминокислот, близкими к предполагаемым.

4. Требования безопасности

При выполнении измерений по настоящей методике соблюдают требования безопасности, регламентированные:

- "Руководством по эксплуатации" хроматографа "Милихром А-02";
- правилами работы в химических лабораториях (работа с концентрированными кислотами, хромовой смесью, щелочами, органическими растворителями).

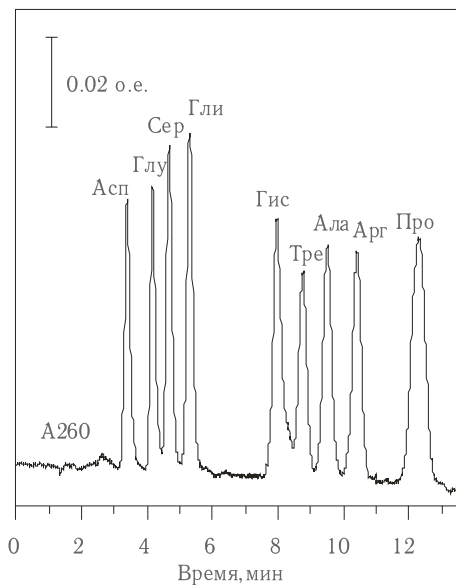


Рисунок 1. Хроматограмма смеси первых ФТК-АК по п.3 (объем пробы 2 мкл, концентрации аминокислот по 0.0002 М).

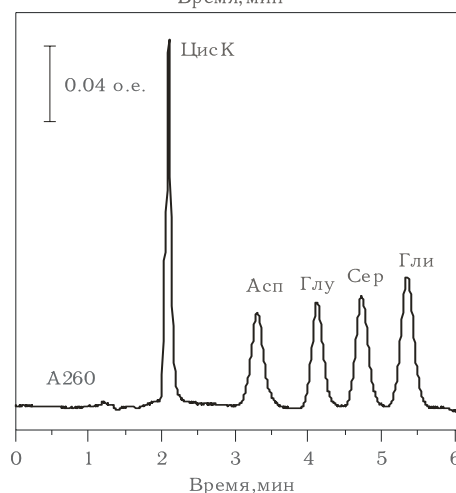


Рисунок 2. Хроматограмма смеси первых ФТК-АК и ФТК цистеиновой кислоты по п.3 (объем пробы 2 мкл, концентрации аминокислот по 0.0002 М).

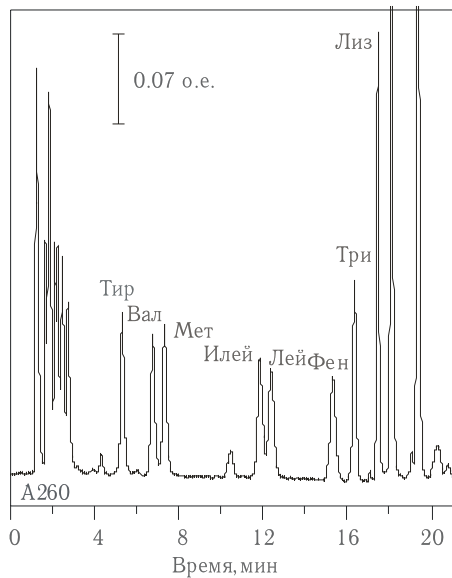


Рисунок 3. Хроматограмма смеси последних девяти ФТК-АК по п.3 (объем пробы 2 мкл, концентрации аминокислот по 0.0002 М).

5. Требования к квалификации оператора

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 "Милихроме А-02" и изучивших настоящую методику.

6. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура воздуха: от 18 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±22В, частота: 50±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 рабочих растворов; приготовление аттестованных смесей.

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°C.

7.3. Подготовка реактивов

7.3.1. Дистиллированную воду, используемую для приготовления элюентов, пропускают через колонку, наполненную обращеннофазным 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 рабочих растворов

7.4.1. **Раствор №1** (1 М водный раствор уксуснокислого аммония для приготовления элюента "А"): 77.08 г уксуснокислого аммония растворяют в стеклянном стакане в 750-800 мл очищенной воды, доводят значение рН раствора до 5.25 добавлением концентрированной ортофосфорной кислоты, количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем жидкости очищенной водой до метки на колбе. 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. **Раствор №2** (2 М водный раствор уксуснокислого аммония для приготовления элюента "Б"): 154.16 г уксуснокислого аммония растворяют в стакане в 750-800 мл очищенной воды, доводят значение pH раствора до 6.50 добавлением концентрированной ортофосфорной кислоты, количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем жидкости очищенной водой до метки на колбе. 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. **Раствор №3** (элюент "А"): градуированной пипеткой объемом 25 мл переносят 50 мл раствора №1 в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем жидкости очищенной водой до метки.

7.4.4. **Раствор №4** (элюент "Б"): градуированной пипеткой объемом 25 мл переносят 50 мл раствора №2 в мерную колбу вместимостью 1 л, мерным цилиндром добавляют 350 мл ацетонитрила и доводят объем жидкости очищенной водой до метки.

7.4.5. **Раствор №5** (Раствор для проведения дериватизации): градуированными пипетками в плотно закрывающуюся колбу объемом 10 мл помещают 5 мл ацетонитрила, 2 мл триэтиламина и 3 мл очищенной воды. Тщательно перемешивают.

7.4.6. **Раствор №6** (Раствор для перерастворения дериватов): градуированными пипетками в плотно закрывающуюся колбу объемом 10 мл помещают 1 мл ацетонитрила и 9 мл раствора №3. Тщательно перемешивают.

7.4.7. **Раствор №7** (0.1 М раствор соляной кислоты для приготовления растворов индивидуальных аминокислот, головного раствора и аттестованных смесей аминокислот) готовят из стандарт-титра соляной кислоты разбавлением в мерной колбе объемом 1 л.

7.4.8. **Растворы индивидуальных аминокислот** (растворы аминокислот, за исключением тирозина, с концентрацией 0.05 М для приготовления аттестованной смеси №1): точные навески аминокислот (табл. 2) помещают в конические колбы объемом 10 мл и растворяют в 5 мл раствора №7, отмеренного градуированной пипеткой.

Таблица 2

№	Аминокислота	М, мг
1	Аланин	22.3
2	Аргинин	52.7
3	Аспарагиновая к-та	33.3
4	Валин	29.3
5	Гистидин	52.4
6	Глицин	18.8
7	Глутаминовая к-та	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 концентрацией 0.0025 М, добавляя его в количестве 4.5 мг в аттестованную смесь №1 по п.7.5.1.

7.5. Приготовление аттестованных смесей

7.5.1. *Аттестованная смесь №1* (раствор аминокислот с молярной концентрацией 2.5 ммоль/л каждой аминокислоты для приготовления аттестованных смесей №№2,3): точную навеску тирозина 4.5 мг помещают в коническую колбу объемом 10 мл и градуированными пипетками добавляют по 0.5 мл раствора каждой аминокислоты и 1.5 мл раствора №7. Тщательно перемешивают.

7.5.2. *Аттестованная смесь №2*. Помещают градуированной пипеткой 0.5 мл аттестованной смеси №1 в полипропиленовую пробирку и добавляют туда градуированной пипеткой 0.5 мл раствора №7.

7.5.3. *Аттестованная смесь №3*. Помещают градуированной пипеткой 0.2 мл аттестованной смеси №1 в полипропиленовую пробирку и добавляют туда градуированной пипеткой 0.6 мл раствора №7.

Растворы №№1; 2; 3; 4; 5; 6 и аттестованные смеси хранят в закрытых емкостях при температуре плюс 5°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 аттестованных смесей, в свою очередь состоящих из измерений трех аттестованных смесей каждая (аттестованные смеси №№1-3). Каждую серию аттестованных смесей готовят, выполняя последовательно все операции пунктов 7.4.8. - 7.5.3.).

Аттестованные смеси хроматографируют по разд.8 (порядок расположения пиков на хроматограмме показан на рис.1,2,3). С использованием полученных хроматограмм, в рамках прилагающегося к хроматографу программного обеспечения, определяют зависимость между массовыми концентрациями аминокислот, выраженными в г/л, и соответствующими площадями пиков. Таблица концентраций аминокислот в аттестованных смесях, выраженных в г/л, приводится в приложении.

Рассчитывают коэффициент корреляции r полученной зависимости. Если $r < 0.92$, то выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, устраняют их и повторяют градуировку.

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 концентраций аминокислот градуированной пипеткой помещают 2.5 мл исследуемого раствора в мерную колбу объемом 25 мл и доводят объем жидкости раствором №7 до метки.

7.7.3. Непосредственно перед хроматографированием, для определения массовой концентрации основных аминокислот, за исключением цистеина, в анализируемом растворе выполняют следующую обработку пробы:

7.7.3.1. Микрошприцем помещают 10 мкл исследуемого раствора в полипропиленовую пробирку объемом 1.5 мл и упаривают досуха в вакууме при температуре 25°C (водяная баня термостата). Добавляют микрошприцем в пробирку 30 мкл раствора №5 и упаривают досуха в вакууме при температуре 25°C. Добавляют микрошприцем в ту же пробирку 20 мкл раствора №5, 2 мкл ФИТЦ, перемешивают и выдерживают 20 мин при температуре 25°C. Для удаления из реакционной смеси растворителей и остатков ФИТЦ пробирку выдерживают 20 мин в вакууме при температуре 25°C. Растворяют сухой остаток в 125 мкл раствора №6, перемешивают встряхиванием.

7.7.3.2. Для определения цистеина 10 мкл исследуемого раствора помещают в полипропиленовую пробирку объемом 1.5 мл и упаривают досуха в вакууме при температуре 25°C. Растворяют содержимое в 10 мкл муравьиной кислоты, встряхивая в течение 1 мин, и добавляют 2 мкл концентрированной перекиси водорода. Выдерживают 25 минут при температуре 25°C, добавляют 10 мкл воды и упаривают

досуха в вакууме при температуре 25°C (за 10 мин). Далее выполняют дериватизацию по п.7.7.3.1, растворяя на последнем этапе сухой остаток в 120 мкл раствора №6 и 5 мкл ТЭА.

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
λ детектора	246 нм и 260 нм
Расход элюента	200 мкл/мин
Температура термостата колонки	50°C.

8.2. Хроматографирование аттестованных смесей и анализируемых растворов.

8.2.1. Дозируя автосамплером хроматографа, хроматографируют 2 мкл дериватизированной по п.п. 7.7.3.1 или 7.7.3.2 аттестованной смеси (по п.7.5) или анализируемого раствора, полученного по п.7.7.2. или 8.3.1.

8.2.1.1. Для определения первых 9 аминокислот (п.3) хроматографирование выполняют при градиентном элюировании со следующими параметрами:

Таблица 3

Степень градиента	Объем ступени, мкл	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 (п.3) записывают хроматограмму 2 мкл раствора, полученного по п. 7.7.3.2., в условиях по п. 8.2.1.1.

8.2.1.3. Для определения остальных аминокислот (п.3), повторно дозируя автосамплером хроматографа, хроматографируют 2 мкл раствора, полученного по п.7.7.3.1. Хроматографирование выполняют при градиентном элюировании со следующими параметрами:

Таблица 4

Степень градиента	Объем ступени, мкл	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 производных аминокислот по временам удерживания и спектральным отношениям, сравнивая с временами удерживания и спектральными отношениями $R=S_{260}/S_{246}$ на градуировочной хроматограмме аттестованной смеси. Различия времени удерживания для соответствующих пиков не должны превышать $\pm 3\%$. Ориентировочные значения R приведены в Приложении.

8.3.1. С помощью созданной по аттестованным смесям градуировочной зависимости при λ 260 нм, используя прилагаемое к хроматографу программное обеспечение, по хроматограммам раствора, приготовленного по п.7.7.2, приближенно оценивают концентрации основных аминокислот в анализируемом растворе, с учетом разбавления по п.7.7.2. Затем, для точного определения концентраций, 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 объемом 0.2 или 1 мл

помещают в мерную колбу объемом 25 мл и доводят объем жидкости раствором №7 до метки. Раствор, разбавленный соответствующим образом, хроматографируют по п.8.2. Каждую хроматограмму записывают дважды.

Таблица 5

Диапазон концентраций аминокислот, г/л	Коэффициент разбавления	Объем анализируемой пробы, мл
70-30	200	0.125
30-10	100	0.25
10-5	30	0.83

9. Обработка результатов измерений

9.2. Используя прилагаемую к прибору программу обсчета хроматограмм, рассчитывают массовую концентрацию основных аминокислот во введенной пробе и результат умножают на коэффициент разбавления (табл. 5).

9.3. Расхождение между результатами двух параллельных измерений не должно превышать норматив d , составляющий $\pm 3\%$.

Если $\left| C_i^1 - C_i^2 \right| \leq d$, результаты измерений усредняют

$$\bar{C}_i = \frac{C_i^1 + C_i^2}{2}$$

В случае превышения норматива d повторяют эксперимент. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа, устраняют их и повторяют эксперимент.

10. Оформление результатов анализа

Результат измерений оформляют записью в журнале и представляют в виде

$$C(\text{г/л}) = C_{cp.} \pm \Delta C,$$

где

$C_{cp.}$ – среднее значение из двух измерений

ΔC – доверительный интервал, указанный в п.1.1, 15%.

11. Контроль точности измерений

11.1. Оперативный контроль сходимости

Оперативный контроль сходимости осуществляют постоянно путем оценки расхождения параллельных результатов анализов по п.9.3.

11.2. Оперативный контроль точности

Контроль точности и градуировки осуществляют периодически 1 раз в месяц по аттестованным смесям в точном соответствии с прописью методики по п.п. 8.2- 9.2.

Результаты считают удовлетворительными, если выполняется соотношение

$$|C_{cp.} - C| \leq K,$$

где

$C_{cp.}$ - результат анализа пробы с добавкой;

C - результат анализа пробы без добавки;

K - норматив оперативного контроля.

Норматив оперативного контроля рассчитывают по формуле

$$K = 0,84 \cdot \sqrt{(\Delta C_{доб})^2 + (\Delta C)^2},$$

где

$\Delta C_{доб}$ - доверительный интервал пробы с добавкой;

ΔC - доверительный интервал пробы без добавки.

Если соотношение не выполняется, повторяют эксперимент. При повторном превышении норматива K выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным

результатам анализа, устраняют их и повторяют эксперимент. При необходимости проводят переградуировку хроматографа.

Перечень ссылочных документов и литература

1. M.M.T.O`Hare, O.Tortora и др, *J.Chromatogr.*, 1987, **v.389**, pp.379-388.
2. R.F. Ebert, *Analyt.Biochem.*, 1986, v.154, pp. 431-435.
3. C.Y.Yang, F.I. Sepulveda, *J.Chromatogr.*, 1985, **v.346**, pp.413-416.
4. F.Sanger, *Biochem. Journ.*, 1949, **v.44**, pp.126-128.
5. C.H.W. Hirs, *J.Biol.Chem.*, 1956, **v.219**, pp.611-621.

Концентрации аминокислот в аттестованных смесях
и ориентировочные значения спектральных отношений^{*)}.

№	Аминокислота	S ₂₆₀ /S ₂₄₆	Концентрация, г/л		
			Аттестованная смесь №1, 0.0025 М	Аттестованная смесь №2, 0.00125 М	Аттестованная смесь №3, 0.00062 М
1	Аланин	0.77	0,223	0,111	0,055
2	Аргинин	0.77	0,527	0,263	0,131
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	0,524	0,262	0,130
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	0,457	0,228	0,113
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	0,394	0,197	0,098

^{*)}Значения спектральных отношений, полученные на другом хроматографе, могут отличаться от приведенных в Таблице из-за погрешности настройки детектора. Характерная погрешность приведенных спектральных отношений составляет примерно ±0.02