

O'ZBEKISTON MILLIY STANDARTI

JUN - QOG'OZ ELEKTROFOREZI VA KOLORIMETRIYA USULI BILAN JUN
GIDROLIZATLARINING SISTEIN KISLOTASI MIQDORINI ANIQLASH

(ISO 2915:1975, IDT)

Rasmiy nashr

O'zbekiston standartlar instituti

Toshkent

So‘z boshi

1. O‘zbekiston standartlar instituti tomonidan QABUL QILISHGA TAQDIM ETILDI.
2. O‘zbekiston standartlar institutining 2024 yil 15-iyuldagi 37/XSt-sonli buyrug‘i bilan TASDIQLANDI VA AMALGA KIRITILDI.
3. Ushbu standart ISO 2915:1975 “Wool — Determination of cysteic acid content of wool hydrolysates by paper electrophoresis and colorimetry” xalqaro standartiga aynan o‘xshash.
4. DASTLABKI AMALGA KIRITILISHI

Ushbu milliy standart va unga bo‘lgan o‘zgartishlarni O‘zbekiston hududida amalga kiritish haqidagi axborot Standartlashtirish bo‘yicha milliy organning rasmiy veb-saytlari va standartlarning yillik axborot ko‘rsatkichlarida qayd etiladi. Ushbu standartni qayta ko‘rib chiqish yoki bekor qilish haqidagi muvofiq axborot Standartlashtirish bo‘yicha milliy organning rasmiy veb-saytlari va standartlarning yillik axborot ko‘rsatkichlarida qayd etiladi.

Ushbu milliy standartni O‘zbekiston Respublikasi hududida rasmiy chop etish mutlaq huquqi O‘zbekiston standartlar institutiga tegishli

O‘ZBEKISTON MILLIY STANDARTI**JUN - QOG‘OZ ELEKTROFOREZI VA KOLORIMETRIYA USULI BILAN JUN
GIDROLIZATLARINING SISTEIN KISLOTASI MIQDORINI ANIQLASH****ШЕРСТЬ - ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИСТЕИДНОЙ КИСЛОТЫ В
ГИДРОЛИЗАТАХ ШЕРСТИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА И КОЛОРИМЕТРИИ
БУМАГИ****WOOL — DETERMINATION OF CYSTEIC ACID CONTENT OF WOOL HY-
DROLYSATES BY PAPER ELECTROPHORESIS AND COLORIMETRY**

Amalga kiritish sanasi 15.09.2024 y.

0 KIRISH

Ushbu milliy standart Xalqaro jun-to‘qimachilik tashkiloti tomonidan tuzilgan IWTO 23-70 test usuliga asoslangan.

Sistein kislota sistem va sistein aminokislotalarining oksidlanish mahsulotlaridan biridir. Xom junda sistein kislota miqdori, odatda, juda past bo‘lib, fotokimyoviy degradatsiya (shonalash) bilan ortadi. Oqartirish yoki xlorlash kabi yakuniy jarayonlar har doim sistein kislotasining ko‘payishiga olib keladi.

Oksidlanishning har qanday turining og‘irligi to‘g‘ridan-to‘g‘ri sistein kislotasini miqdoriy aniqlash orqali aniqlanishi mumkin. Ba’zi hollarda davolanmagan materialning tegishli namunalarida yoki shikoyat qilinishi mumkin bo‘lmagan materiallarda qiyosiy testlarni o‘tkazish foydali bo‘lishi mumkin.

1 Qo‘llanish sohasi

Ushbu milliy standartda jun gidrolizatlarining sistein kislota miqdorini qog‘oz elektroforezi va kolorimetriya yordamida aniqlash usuli ko‘rsatilgan.

Usul bo‘yashdan oldin yoki keyin har qanday shaklda bo‘lgan to‘liq junli to‘qimachilikka nisbatan qo‘llaniladi, masalan, jun, shlif, shlak, ip yoki mato. Aralashmalarni sinashda junning ulushi aniq bo‘lishi kerak. Usul karbonizatsiyadan keyingi jun uchun ham qo‘llaniladi.

2 Tamoyil

Junning gidrolizi, so‘ngra qog‘oz elektroforezi yo‘li bilan olingan gidrolizat tarkibidagi sistein kislotasini boshqa aminokislotalardan ajratish. Qog‘oz tasmasini bo‘yash va sistein kislota bo‘lgan sohani ajratish. Bir vaqtning o‘zida qog‘oz tasmasiga qo‘llanilgan ma‘lum miqdordagi kislota bilan taqqoslab, sistein kislota tarkibini kolorimetrik aniqlash.

3 Reagentlar

Tahlil jarayonida faqat analitik reagentlar sinfiga mansub reagentlardan va faqat distillangan suv yoki unga teng tozalikka ega bo‘lgan suvdan foydalaniladi.

3.1 Metanol.

3.2 Xlorid kislota, konsentrlangan xlorid kislotaning 5,7 N eritmasi, p 1,19 g/ml, azeotropik distillangan.

Izoh – Ushbu milliy standartdan foydalanishda havola qilinayotgan standartlarni O‘zbekiston hududida amal qilishini joriy yilning 1 yanvar holati bo‘yicha tuzilgan muvofiq standartlar ko‘rsatkichi (tasniflagichi) bo‘yicha hamda joriy yilda chor etilgan axborot ko‘rsatkichlari bo‘yicha tekshirish maqsadga muvofiq bo‘ladi. Agarda havola qilinayotgan standart almashtirilgan (o‘zgartirilgan) bo‘lsa, unda ushbu milliy standartdan foydalanish chog‘ida almashtirilgan (o‘zgartirilgan) standartga amal qilishi kerak. Agarda havola qilingayotgan standart almashtirilmagan bekor qilingan bo‘lsa, unga havola qilingan qoida ushbu havolaga dahldor bo‘lmagan qismida qo‘llaniladi.

3.3 Ningidrin-kadmiy reagenti.

100 mg kadmiy atsetatini 10 ml suvda eritib, ketma-ket 5 ml muz sirka kislotasi, 100 ml atseton va 1 g ningidrin qo'shing. Reagentni bir hafta davomida jigarrang butilkada muzlatgichda saqlash mumkin. Bo'yash uchun ishlatiladigan reagentning har bir qismi faqat bir marta ishlatiladi.

3.4 Bufer eritma, pH 3,5.

890 ml distillangan suvda 10 ml piridin va 100 ml muz sirka kislotasini eritish. Bufer eritma besh marta ajratilgandan so'ng yangilanishi kerak.

3.5 Sistein kislotasining standart eritmasi.

100 ml o'lchov kolbasasida distillangan suvda 110,6 mg sistein kislotasi monogidratini (100 mg suvsiz sistein kislotasiga to'g'ri keladi) eritish. Tarozida tortishdan oldin, sistein kislotani fosfor besh oksidi ustida quritish pistoletida taxminan 70 °C haroratda 24 soat davomida quriting.

3.6 Bariy xlorid eritmasi.

2,5 g bariy xlorid digidratini ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) distillangan suvda 100 ml o'lchov kolbasasida eritish.

4 Uskunalar

4.1 Shishalarni tarozida tortish.

4.2 Analitik muvozanat, aniqlik 0,000 2 g.

4.3 Sinov namunalari 105 ± 2 °C da quritish va gidrolizlash uchun va qog'oz tasmlarini 70 °C da quritish uchun ventilyatsiyalangan quritish pechi.

4.4 Quritgich.

4.5 Qalin devorli shisha naycha, diametri taxminan 2 sm, uzunligi 30 sm.

4.6 Forsunka va shisha sterjen.

4.7 Puflash quvuri.

4.8 Shisha keskich.

4.9 Pipetka, 20 ml.

4.10 Pipetkalar, 2 × 1 ml.

4.11 Kalibrlangan pretsizion pipetkalar, 0,01 ml.

4.12 Dumaloq tubli kolbalar, 100 ml va 250 ml.

4.13 O'lchov kolbasi, 100 ml.

4.14 O'lchov kolbalari, 2 × 5 ml.

4.15 Piyola 250 ml.

4.16 Rotatsion bug'latgich.

4.17 Elektroforez kamerasi va elektr ta'minoti uskunolari.

4.18 Filtr qog'ozi tasmlari yoki varaqlari (Uoimen No 1, Shleyxer va Shull No 2043 aMgl yoki shunga o'xshash sifatdagi boshqa qog'ozlar).

4.19 Stendli probirkalar.

4.20 Shisha idishlar.

4.21 Spektrofotometr yoki 500 ± 10 nm da maksimal yutilishga ega bo'lgan filtrli fotometr.

Uskuna optik zichlikni 0 dan 0,7 gacha oraliqda 0,01 gacha aniq o'lchash imkoniyatiga ega bo'lishi kerak, bu keyingi o'nli kasr hisoblanadi.

4.22 Termostat bilan boshqariladigan moy vannasi (yuqori qaynash harorati) yoki asbest plastina bilan jihozlangan issiq plita (qarang 6.3).

4.23 Reflyuks kondensatori.

5 Sinov namunalari tanlash va tayyorlash

Tekshiriladigan materialning namunasini oling va quyidagi sinov namunalari ta'minlash uchun yetarli darajada katta bo'lsin:

- quruq massani aniqlash uchun har birining massasi taxminan 1 g bo'lgan ikkita sinov namunasi;

- gidrolizatni tayyorlash uchun massasi taxminan 1 g bo'lgan bitta sinov namunasi.

Yumshoq jun, roving va boshqa namunalardan barcha o'simlik moddalari va boshqa begona moddalarni chiqarib tashlang. Ajratib olishdan oldin ip yoki mato namunalarini qisqa uzunlikdagi (taxminan 1 sm) iplarga ajrating. Ipga ajratib bo'lmaydigan titilgan materiallarni avval mayda bo'laklarga bo'lish kerak. Namunani dixlormetan bilan Soxhlet apparatida 1 soat davomida soatiga 6 sikldan kam bo'lmagan tezlikda ajratib olinadi va tozalangan namunadan dixlormetan bug'latiladi.

6 Jarayon

6.1 Sinov namunalarini tortish

5. 5-bandda tavsiflangan uchta sinov namunasi 0,000 2 g aniqlikda ketma-ket tortilsin. Quruq massani aniqlash uchun ikkita sinov namunasidan foydalaning (6.2-rasmga qarang) va gidrolizat tayyorlash uchun boshqa sinov namunasidan foydalaning (6.3-rasmga qarang).

6.2 Quruq massani aniqlash

Har bir sinov namunasini tarozi idishiga (4.1) o'tkazing va quritish pechida (4.3) 105 ± 2 °C haroratda quriting. Ushbu quritish va tortish operatsiyalarini doimiy massaga erishgunga qadar takrorlang.1)

Sinov namunalarini tarozi idishlaridan oling, tarozi idishlarini tarozida torting va shu bilan sinov namunalarining quruq massasini aniqlang. Gidrolizatning sinov namunasining quruq massasini proporsiya bo'yicha hisoblang.

6.3 Gidroliz

Gidroliz quyidagi usullardan biri bo'yicha amalga oshiriladi:

a) Gidroliz uchun o'lchangan namuna (6.1) va 20 ml 5,7 N xlorid kislota eritmasi (3.2) reflyuks kondensator (4.23) bilan o'rnatilgan 100 ml yumaloq tubli kolbaga (4.12) joylashtiring. Kolbani termostat yordamida boshqariladigan moy hammomida (4,22) 105 °C haroratda 4 soat davomida qizdiring. Moyli vanna o'rniga asbestli plita bilan birgalikda issiq plita ishlatilishi mumkin. Dumaloq tubli kolbani asbest plastinadagi teshik orqali joylashtiring, shunda suyuqlik sathi bu plastinka ustida ko'rinib turadi; kolbaning pastki qismi issiq plastinkaga tegmasligi kerak.

b) Gidroliz uchun tarozida tortiladigan sinov namunasini (6.1) qalin devorli shisha naychaga (4.5) joylashtiring va pipetka (4.9) orqali 20 ml 5,7 N xlorid kislota eritmasini qo'shing. Quvurni puflash quvuri (4,7) bilan zichlab, quritish pechida 24 soat davomida 105 °C haroratda qizdiring. Nayni oraliq bilan yaxshilab silkiting, shunda gidrolizatda tola qoldig'i qolmaydi.

a) yoki b) usul bilan olingan gidrolizatni distillangan suv bilan yuvishni o'z ichiga olgan holda uzatish:

- 250 ml li dumaloq tubli kolbaga (4.12) solinadi, bu yerda namuna uglerodsizlantirilgan jundan iborat; yoki

- 250 ml li stakanga (4,15), bu yerda namuna uglerodlangan jundan olinadi¹⁾ va qaynash haroratigacha qizdiriladi. Eritma qaynagandan so'ng, distillangan suv bilan aralashtirib, pipetka (4.10) orqali 1 ml bariy xlorid eritmasi (3.6) tomchilab qo'shiladi.

Nihoyat, ikkala holatda ham eritmani 50 °C haroratda rotatsion bug'latgichda (4,16) sirop konsistensiyasigacha konsentratsiya qiling. Ortiqcha xlorid kislotani yo'qotish uchun siropni 10 ml distillangan suv bilan uch marta aralashtiring va har safar rotatsion bug'latgichda konsentratsiya qiling. Qoldiqni distillangan suv bilan 5 ml li o'lchash kolbasiga (4,14) to'liq quyuing va markasigacha suyultiring.

6.4 Elektroforez

Elektroforetik ajratish uchun past kuchlanishli qurilmadan foydalanish mumkin. Buning uchun taxminan 300 V chiqish quvvatiga ega bo'lgan har qanday uskuna mos keladi. Tahlilni tezlashtirish uchun yuqori chiqish kuchlanishli (1500 V gacha) qurilmadan foydalanish mumkin. Ajratish kamerasi kamida 30 sm uzunlikdagi qog'oz tasmalarini qabul qila olishi kerak (elektrodlar orasidagi masofa).

Qog'ozning o'rtasi bo'ylab qalam bilan vertikal chiziq belgilang (4.18). So'ngra pretsizion pipetka (4.11) yordamida ikkita quruq qog'oz tasmasining har birining qalam chizig'iga 0,01 ml har bir sinov gidrolizati (6.3) dan tasma shaklida, ikkilamchi sinovlar uchun surtiladi.

Boshqa qog'oz tasma yoki varaqda belgilangan chiziqning boshqa qismidan foydalanib, 0,01 ml standart kislota eritmasidan (3.5) surting. Qog'oz chetidan 0,5 sm masofada har doim pipetka ichidagi narsalar to'liq va bir tekis surtilishiga e'tibor berish kerak. Ikkita qog'oz tasma elektrod kamerasiga kiritilgandan so'ng, filtr qog'ozi bufer eritmasini (3.4) bir tekisda yutishiga imkon bering. Qog'ozni bufer bilan purkash yo'li bilan bu jarayon uchun ketadigan vaqt qisqartiriladi.

Qog'oz bufer bilan to'liq to'yinganida, taxminan 5 dan 8 V/sm gacha potentsialni qo'llang (ya'ni qog'ozning uzunligiga qarab 200 dan 300 V gacha). Elektroforez 4-5 soatdan keyin yakunlanadi.

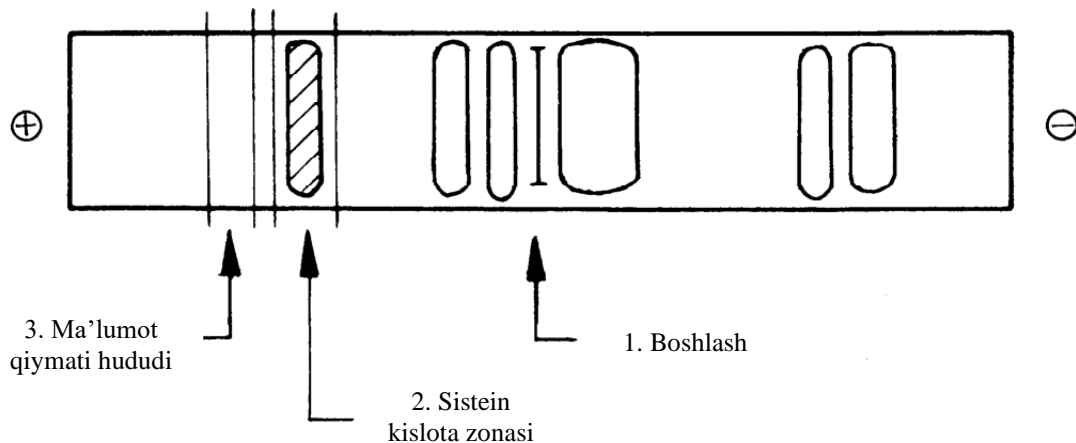
Qog'oz tasmlarini (yoki varaqlarini) quritish pechiga (4.3) qog'ozning anodli uchi eng yuqori qismida osib qo'ying va 70 °C da 30 daqiqa davomida quriting.

6.5 Rangni shakllantirish va ajratish

Quritilgan qog'oz tasmlariga (yoki varaqlarga) oz miqdorda ninhidrin-kadmiy eritmasi (3,3) shimdiring va tekis shisha idishga (4,20) joylashtiring. Qog'oz faqat reagentni yutishi kerak va hech qachon unga botirilmassligi kerak.

Qog'ozlarni, anod uchini yuqoriga osib, quritish pechiga qo'ying va 70 °C haroratda 30 daqiqa davomida quriting. Qo'llanilgan kuchlanish va elektroforez davomiyligiga qarab, sistein kislotasi zonasi anod yo'nalishida dastlabki holatidan 4 dan 6 sm gacha siljiydi.

Gidrolizatdan va standart eritmadan ikkita sistein kislotasi "dog'i" bo'lgan qog'ozning teng maydonlarini kesib oling va mayda bo'laklarga bo'lgandan so'ng, qog'ozni uchta dog'ning har biridan alohida probirkalarga joylashtiring (4.19). To'rtinchi probirkaga sistein kislotasi zonasi va qog'ozning anod uchi o'rtasidan olingan qog'ozning teng yuzasini joylashtiring (diagrammaga qarang) va umumiy qog'oz bilan bir xil fon rangini ko'rsating. Ushbu qog'ozdan olingan elyut referent qiymatni beradi.



1-rasm - elektroforetik ajratish diagrammasi

4 ta probirkalarning har biriga 5 ml metanol (3,1) solingan naycha. Yorug'lik bir necha marta silkitilgandan so'ng, qizil rang qog'ozdan 30 daqiqa ichida eriydi.

6.6 Kolorimetriya

10 mm li yacheykalarda 500 ± 10 nm to'lqin uzunligida optik zichlikni o'lchang. Optik zichlik qiymati 0,2-0,7 oralig'ida bo'lishi kerak. Agar yuqoriroq qiymatlar olingan bo'lsa yoki sistein kislotasining juda yuqori miqdori kutilayotgan bo'lsa, kichikroq sinov namunasidan foydalaning yoki gidrolizatni 10 ml o'lchov kolbasida hajmgacha tayyorlang.

Qog‘oz qoldiqlarini olib tashlash uchun kislota va gidrolizatning standart eritmasidan olingan kislota elyuatlarini filtrlang. Fotometrik o‘lchovlarni har biri qog‘ozning asosiy soyasidagi elyuat yordamida “blank” sifatida amalga oshiring.

7 Sistetik kislota miqdorini hisoblash

Sistein kislotasining miqdori, C , massa bo‘yicha foizlarda quyidagi formula bilan ifodalanadi:

$$C = \frac{C_S \times V_T}{V_H \times 10^6} \times \frac{D_H}{D_S \times m} \times 100$$

Bu yerda

C_S - qo‘llanilgan standart eritma hajmida mavjud bo‘lgan sistein kislotasining mikrogrammdagi massasi;

V_T - gidrolizat tayyorlangan o‘lchash kolbasining hajmi, ml;

V_H - qo‘llanilgan gidrolizatning hajmi, ml;

D_H - gidrolizatdan olingan sistein kislota zonasining optik zichligi;

D_S - standart eritmadan sistein kislota zonasining optik zichligi;

m - tahlil namunasining quruq massasi, g.

Agar C_S , V_T va V_H uchun har doim bir xil kattaliklar ishlatilsa, yuqoridagi formula quyidagicha soddalashtiriladi:

$$C = \text{factor} \times \frac{D_H}{D_S \times m} \times 100$$

Natijani ikki xonali o‘nli kasrga ifodalang.

8 Sinov hisoboti

Sinov hisobotida quyidagi ma’lumotlar bo‘lishi kerak:

- a) foydalanilgan usulning havolasi;
- b) natijalar va qo‘llanilgan ifoda usuli;
- v) aniqlash paytida qayd etilgan har qanday g‘ayrioddiy xususiyatlar;
- d) ushbu milliy standartga kiritilmagan yoki ixtiyoriy deb hisoblanadigan har qanday operatsiya.

Ilova**Usulning aniqqligi**

Dastlabki laboratoriyalararo sinovdan so'ng, 10 ta laboratoriya ishtirokida ikkinchi sinov o'tkazildi.

Har bir laboratoriya har xil miqdordagi sistein kislotasi bo'lgan ikkita jundan ikkita gidrolizat (bitta 24 soatlik gidrolizat va bitta 4 soatlik gidrolizat) tayyorladi, har bir gidrolizat bo'yicha takroriy aniqlashlar amalga oshirildi.

Ikki xil gidroliz vaqti uchun natijalar yaxshi mos keladi, shuning uchun quyidagi jadvalda faqat 24 soatlik gidroliz qiymatlari keltirilgan.

	Jun A	Jun B
Jundagi o'rtacha sistein kislotasi miqdori, %	0,20	0,75
Laboratoriyalar o'rtasidagi standart og'ish L_s komponentlarining taxminiy qiymati, % sistein kislotasi	muhim emas	0,066
Gidrolizatlar o'rtasidagi standart og'ish sh komponentlarining taxminiy qiymati, % sistein kislotasi	0,013	0,026
Takrorlar o'rtasidagi standart og'ish sr komponentlarining taxminiy qiymati, % sistein kislotasi	0,012	0,015

Ushbu ma'lumotlar yuqorida keltirilgan usul bilan sistein kislotasi tarkibini aniqlashda kutilayotgan ishonchlilik chegaralarini hisoblash imkonini beradi.

A.1 Bitta laboratoriya natijalari uchun ishonch limitlari.

Agar laboratoriyalar o'rtasidagi standart chetlanish hisobga olinmasa (laboratoriya ichida taqqoslash), laboratoriya uchun o'rtacha qiymatlarning T_1 ishonchlilik chegaralari 95% statistik ahamiyatlilik (xatolik ehtimoli 5%) taxminan formula bilan berilgan.

$$T_i = \pm 2 \sqrt{\frac{s_H^2}{j} + \frac{s_R^2}{j \times k}} \text{ \% cysteic acid,}$$

Bu yerda j - gidrolizatlar soni va k - har bir gidrolizat uchun determinatsiyalar soni.

Yuqoridagi jadvaldan s_H va s_R ning taxminiy qiymatlarini olish kerak.

A.2 Laboratoriyalar o'rtasida standart chetlanishni hisobga olgan holda ishonch chegaralari.

Laboratoriyalar o'rtasidagi standart chetlanish (turli laboratoriyalar o'rtasidagi taqqoslash) hisobga olinsa, ishonchlilik chegaralari, T_L , 95% statistik ahamiyatga ega (xatolik ehtimoli 5%), taxminan formula bilan beriladi.

$$T_L = \pm 2 \sqrt{\frac{s_L^2}{j} + \frac{s_H^2}{i \times j} + \frac{s_R^2}{i \times j \times k}} \text{ \% sistein kislotasi}$$

bunda ishtirok etuvchi I ta laboratoriyaning har birida k ta sinovdan o'tkazilgan j ta gidrolizat o'tkaziladi.

$I=1$ bo'lganda laboratoriyalararo dispersiyani hisobga olgan holda alohida laboratoriyalar uchun ishonchlilik chegaralari olinadi.

Jadvaldan s_L , s_H va s_R uchun taqribiy sonli qiymatlarni olish kerak.