СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора БелГИМ

_____ Коломиец

«16» 10 2009

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь

_____ В.И. Качан

_____ 2009 г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ β-КАРОТИНА В СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

МВИ.МН 3239-2009

МВИ аттестована
РУП "Белорусский государственный
институт метрологии"
Свидетельство об аттестации
№ 538/2009
от "19" 10 2009 г.

Минск 2009

gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

1	Область применения	3
2	Показатели прецизионности методики	3
3	Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы	4
4	Метод измерения	5
5	Требования безопасности	5
6	Требования к квалификации оператора	6
7	Условия выполнения измерений	6
8	Подготовка к выполнению измерений	6
9	Выполнение измерений	9
10	Обработка результатов измерений	9
11	Оформление результатов измерений	10
12	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	11
13	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости	12
13	Проверка стабильности результатов испытаний	12
	Приложение А Нормативные ссылки	14
	Приложение Б Пример методики расчета неопределенности измерений	15

1 Область применения

Методика предназначена для определения содержания β-каротина (мг/100 г) в специализированных продуктах питания (пищевые продукты, обогащенные витаминными премиксами, продукты для питания детей, беременных женщин и кормящих матерей, спортсменов, биологически активные добавки к пище, витаминные премиксы, предназначенные для обогащения продуктов питания), а также может быть использована для определения содержания β-каротина в необогащенных продуктах питания.

β-Каротин относится к группе каротиноидов, в которую входит большое количество соединений с различной биологической активностью. Наиболее активным является β-каротин – его активность принята за 100 %. Молекула β-каротина состоит из сорока атомов углерода, включает сопряженную полиеновую систему, которая располагается между двумя циклогексеновыми кольцами. Химическая формула $C_{40}H_{56}$. М.в. 536,9, $t_{пл.}$ 183 °С. Оптически неактивен. Растворим в гексане, сероуглероде, дихлорэтане, хлороформе, изопропаноле, бензоле и кипящем петролейном эфире. Легко расщепляется под действием ультрафиолетового света, кислорода, устойчив к сильным щелочам.

Метод определения основан на экстрагировании β-каротина из продуктов органическим растворителем с последующим анализом экстракта спектрофотометрическим методом.

Диапазоны измерений:

для продуктов питания 0,01 – 10,00 мг/100 г;

для БАД и витаминных премиксов св. 10,00 – 2000,00 мг/100 г.

Нижний предел измерения методики (LOQ) составляет 0,01 мг/100 г.

Диапазон определяемых концентраций в спектрофотометрируемом объеме 0,25 – 7,00 мкг/см^3.

2 Показатели прецизионности методики

Относительные значения показателей прецизионности (повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости) при доверительной вероятности P=0,95 МВИ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной воспроизводимости МВИ при доверительной вероятности P=0,95

Диапазон измерений (мг/100 г)	Показатель повторяемости, % σ_r	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости,% σ_R
0,01 – 1,00 вкл.	5,3	7,3
св. 1,00 – 10,00 вкл.	2,7	4,1
св. 10,00 – 2000,00 вкл.	0,4	1,6

Относительные значения пределов повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности P=0,95 указаны в таблице 2 .

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Таблица 2 – Относительные значения пределов повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности P=0,95

Диапазон измерений (мг/100 г)	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений),% r	Предел внутрилабораторной воспроизводимости (для двух результатов анализа),% R
0,01 – 1,00 вкл.	15	20
св. 1,00 – 10,00 вкл.	8	12
св. 10,00 – 2000,00 вкл.	1	5

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Спектрофотометр, обеспечивающий измерения в диапазоне длин волн 220-800 нм;
Пределы измерений (0,0 ÷ 2,0) Б;
Класс точности (погрешность) ± 0,015Б
Дискретность шкалы 0,0001 Б
Весы лабораторные электронные, (диапазон взвешивания 0,0100-210,0000 г, погрешность взвешивания 0,3 мг)

Колбы мерные	2-25-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-50-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-100-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-200-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-250-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
Колбы конические	2-100-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-250-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
Пипетки градуированные	1-1-2-1	ГОСТ 29227-91
	1-1-2-5	ГОСТ 29227-91
	1-2-2-10	ГОСТ 29227-91
Пипетки с одной отметкой	2-2-25	ГОСТ 29169-91
Цилиндры мерные на 100см^3		ГОСТ 1770-74
Колбы круглодонные	30 см^3	ГОСТ 23932-90
	50 см^3	ГОСТ 23932-90
	100 см^3	ГОСТ 23932-90
	250 см^3	ГОСТ 23932-90

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Испаритель ротационный		фирма Buchi
Часы класса 2		ГОСТ 3145-84
Водяная баня шестиместная, обеспечивающая поддержание заданного температурного режима 90 °С (40 - 90 °С, ±1°С)		тип 1031/1032
Холодильник обратный		ГОСТ 25336-82
Воронки делительные	500,0 см^3	ГОСТ 25336-82

3.3 Реактивы и материалы

Ацетон, чда или хч	ГОСТ 2603-79
Хлороформ, хч	ГОСТ 20015-88
Эфир диэтиловый, чда или хч	ТУ 2600-001-43852015-2005
Гексан, хч	ТУ 2631-018-04683480-2007
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328-77
Спирт этиловый	ГОСТ 18300-87
Сульфат натрия безводный, ч	ГОСТ 4166-76
Кислота аскорбиновая	ФС 42266889
Фенолфталеин	ТУ 6-09536087
Фильтр «синяя лента»	ГОСТ 12026-76
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства по метрологическим и техническим характеристикам, не уступающие рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты

4 Метод измерения

Метод основан на экстракции β-каротина органическим растворителем (гексаном или хлороформом) и измерении оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 450 нм (растворитель – гексан), при длине волны 465 нм (растворитель – хлороформ). Для расчета используются табличные значения коэффициентов оптической плотности 1 % раствора β-каротина в 1 см^3 (ед. оптич. плотности × см^{3}мг$^{-1}$см$^{-1}$) в гексане $E^{1\%}_{1см} = 2550$ или в хлороформе $E^{1\%}_{1см} = 2592$ [8, 9, 10].

5 Требования безопасности

При выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности (ГОСТ 12.2.003);
- пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004);
- техники безопасности при работе в химической лаборатории;

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

6 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие настоящую методику, прошедшие подготовку для работы на спектрофотометре.

7 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150 должны быть соблюдены следующие условия.

- температура воздуха при приготовлении растворов (20 ± 2)°С;
- температура воздуха при выполнении измерений (20 ± 5)°С;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630 - 800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха (65 ± 15) % при температуре 25°С;
- напряжение питающей сети (220 ± 10) В;
- частота переменного тока (50 ± 0,5) Гц.

Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

8 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, отбор и подготовка проб к анализу.

8.1 Подготовка измерительной аппаратуры

Включают спектрофотометр согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочий режим измерения длины волны 450 нм (или 465 нм). Измерения проводят не раньше, чем через 30 минут после включения прибора.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление смеси ацетон:гексан (1:1)

В колбе вместимостью 250 $см^3$ с пришлифованной пробкой смешивают 100 $см^3$ ацетона и 100 $см^3$ гексана при (20±2) °С. Готовится непосредственно перед анализом.

8.2.2 Приготовление водного раствора 50 % NaOH

К 50 г NaOH добавляют 50 $см^3$ дистиллированной воды, осторожно перемешивают и охлаждают до комнатной температуры. Годен 6 мес. Хранить в стеклянной посуде с притертой полимерной пробкой при комнатной температуре в затемненном месте.

8.2.3 Приготовление спиртового раствора 10 % NaOH

К 10 г NaOH добавляют 112,3 $см^3$ этилового спирта (ρ=0,8014), осторожно перемешивают и охлаждают до комнатной температуры. Готовится непосредственно перед анализом.

Государственный институт технической информации нормативной документации

8.3 Подготовка анализируемых образцов

Отбор проб осуществляется согласно ТНПА на продукцию.

Анализируемый продукт 400 – 500 г термостатируют при температуре (20 ± 2) °С в течение 30 минут. Твердые образцы предварительно измельчают с помощью ножа, терки, ступки и т.п., гомогенизируют в блендере, тщательно перемешивают.

8.3.1 Молочные продукты, детское питание на молочной основе, мясопродукты, яйца, рыбопродукты, кондитерские изделия, продукты переработки растительных масел, пищевые добавки

В том случае, если исследуемый продукт обогащен β-каротином, навеска образца должна составлять 1 - 7 г, если объект исследования содержит натуральное количество β-каротина, навеска может быть увеличена до 20 г. Таким образом, навеску образца 1 - 20 г, взвешивают с точностью ± 0,01 г, помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 - 250 $см^3$. Если исследуемый образец представляет собой сухой порошок - добавляют небольшое количество дистиллированной воды, достаточное для того, чтобы полностью покрыть анализируемую навеску (10 – 20 $см^3$) и вращательными движениями колбы по часовой стрелке перемешивают содержимое. Затем прибавляют 3 - 7 $см^3$ раствора 50 % гидроксида натрия для проведения реакции щелочного омыления пробы, 40 $см^3$ этилового спирта для растворения выделяющегося в результате щелочного омыления β-каротина, а для предотвращения его от разрушения добавляют 0,1 – 0,2 г аскорбиновой кислоты. Смесь кипятят в течение 30 мин на водяной бане 90°С с обратным холодильником. Содержимое колбы охлаждают под струей холодной воды до комнатной температуры и количественно переносят в делительную воронку. Колбу ополаскивают 50 $см^3$ дистиллированной воды и переносят в ту же делительную воронку. Признаком полного омыления служит то, что после добавления воды смесь остается прозрачной. При образовании мути необходимо повторить омыление с новой навеской, увеличив количество щелочи для омыления (но не более 7 $см^3$). После омыления выделившийся β-каротин экстрагируют из смеси диэтиловым эфиром трижды. В первый раз для экстракции используют 50 $см^3$ диэтилового эфира, в двух последующих – по 30 $см^3$. Объединенные экстракты переносят в делительную воронку и отмывают дистиллированной водой от щелочи, контролируя pH промывной воды до нейтральной реакции по фенолфталеину. К экстракту добавляют 8 - 10 г безводного сульфата натрия (Na_2SO_4), выдерживают 20-30 мин в темном месте и фильтруют в круглодонную колбу, промывая Na_2SO_4 небольшими порциями эфира. Эфир отгоняют под вакуумом на ротационном испарителе. Сухой остаток растворяют в точном объеме гексана (но не менее 5 $см^3$).

8.3.2 Концентраты пищевые, хлеб, мука, макаронные изделия, детское питание на зерновой основе

Навеску образца 3 – 5 г взвешивают с точностью ± 0,01 г, помещают в химический стакан

Отдел научно-технической документации

вместимостью 100 см^3, добавляют 20 см^3 дистиллированной воды, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 20 мин. Затем экстрагируют β-каротин смесью ацетон:гексан (1:1), приливая по 25 см^3 экстрагирующего раствора в стакан с подготовленной пробой, перемешивают стеклянной палочкой в течение 1-2 мин и дают смеси отстояться 3-5 мин. Образовавшийся верхний слой, содержащий β-каротин, аккуратно сливают в делительную воронку. Экстракцию повторяют 3-5 раз до тех пор, пока экстрагирующий раствор не перестанет окрашиваться извлекаемым β-каротином (свидетельствует о том, что β-каротин полностью извлечен). Объединенные гексановые экстракты отмывают от ацетона дистиллированной водой порциями по 60- 70 см^3 пять раз. Гексановый экстракт переносят в коническую колбу, добавляют 8 - 10 г безводного сульфата натрия, выдерживают 20-30 мин в темном месте и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 - 200 см^3, промывая Na_2SO_4 небольшими порциями гексана. Объем доводят гексаном до метки.

8.3.3 Плодоовощная продукция, напитки, чай, БАД на растительной основе

а) Навеску пастообразного или сухого образца 1 – 3 г взвешивают с точностью ± 0,01 г, помещают в химический стакан вместимостью 50 см^3, добавляют 10 см^3 дистиллированной воды, перемешивают. Затем экстрагируют β-каротин 15 см^3 ацетона, перемешивают стеклянной палочкой 1-2 мин и дают смеси отстояться 3-5 мин. Образовавшийся верхний слой, содержащий β-каротин, аккуратно сливают в делительную воронку. Экстракцию повторяют до тех пор, пока последняя порция ацетона не перестанет окрашиваться извлекаемым β-каротином. Затем объединенные ацетоновые экстракты встряхивают в делительной воронке с 15 см^3 гексана.

б) Жидкие продукты в количестве 10 –20 г взвешивают с точностью ± 0,01 г, помещают в делительную воронку, добавляют 20 см^3 ацетона, встряхивают в течение 1-2 мин, затем добавляют 15 см^3 гексана.

β-Каротин переходит из нижнего ацетонового слоя в верхний гексановый слой, который собирают в отдельную колбу. Если после встряхивания слои полностью не разделились, добавляют 2-3 см^3 дистиллированной воды. Экстракцию гексаном повторяют еще 2 раза по 15 см^3. Объединенные гексановые экстракты помещают в делительную воронку и отмывают от ацетона дистиллированной водой порциями по 60 – 70 см^3 4 – 5 раз. Гексановый экстракт переносят в коническую колбу, добавляют 8 - 10 г безводного сульфата натрия, выдерживают 20-30 мин в темном месте и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 - 200 см^3, промывая Na_2SO_4 небольшими порциями гексана. Объем доводят гексаном до метки.

При визуально обнаруживаемом содержании хлорофилла в гексановом экстракте (экстракт зеленого цвета) проводят его очистку. Гексановый экстракт помещают в делительную воронку, прибавляют равный объем 10 % спиртового раствора NaOH. Смесь встряхивают до тех пор, пока при визуальном наблюдении хлорофиллы не перейдут в нижний слой спиртовой щелочи (зеленая окраска), который затем сливают. Верхний слой многократно промывают водой до нейтральной

Отдел научно-информации

реакции по фенолфталеину. Гексановый экстракт переносят в коническую колбу, добавляют 8 - 10 г безводного сульфата натрия, выдерживают 20-30 мин в темном месте и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 - 200 см^3, промывая Na_2SO_4 небольшими порциями гексана. Объем доводят гексаном до метки.

При анализе продуктов из моркови и моркови в смеси с компонентами, не содержащими β-каротин, очистку экстракта не производят.

8.3.4 Премиксы, БАД

а) Навеску образца 0,1 – 1,5 г, взвешенную с точностью ± 0,001 г, помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3, добавляют 80 –100 см^3 дистиллированной воды, перемешивают до растворения навески и доводят объем до метки дистиллированной водой. Отбирают 5 см^3 полученного раствора, помещают в делительную воронку, добавляют 40 см^3 ацетона. Из полученной смеси экстрагируют β-каротин гексаном трижды порциями по 30 см^3. Объединенные гексановые экстракты, содержащие β-каротин, помещают в делительную воронку и отмывают гексановый слой от ацетона дистиллированной водой порциями по 60- 70 см^3 пять раз. Гексановый экстракт β-каротина переносят в коническую колбу, добавляют 8 - 10 г безводного сульфата натрия, выдерживают 20-30 мин в темном месте и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 - 200 см^3, промывая Na_2SO_4 небольшими порциями гексана. Объем доводят гексаном до метки.

б) При определении β-каротина в маслах, обогащенных β-каротином, навеску образца 1,0 – 10 г, взвешенную с точностью ± 0,01 г, помещают в мерную колбу, вместимостью 100 – 200 см^3, добавляют 40 – 60 см^3 хлороформа, перемешивают, доводят объем до метки хлороформом.

9 Выполнение измерений

Анализ проводится на спектрофотометре. Полученные по п. 8.3 экстракты помещают в кювету для спектрофотометрирования с толщиной поглощающего свет слоя 1 см^3. Оптическую плотность гексановых экстрактов измеряют при длине волны 450 нм, раствором сравнения служит гексан. Оптическую плотность хлороформенных экстрактов измеряют при длине волны 465 нм, раствором сравнения служит хлороформ. Проводят анализ двух параллельных проб.

10 Обработка результатов измерений

Расчет концентрации β-каротина X (мг/100 г) проводится по формуле:

$$X = \frac{10 \times 100 \times D \times V}{E^{1\%}_{1см} \times m} \times K, \qquad (1)$$

где D – оптическая плотность измеряемого раствора, (ед. оптич. плотности);

V – конечный объем гексанового (хлороформенного) экстракта, см^3;

m – масса навески, г;

$E_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения для 1% раствора β-каротина в 1 см^3 органического растворителя, (ед. оптич. плотности × см^{3}мг$^{-1}$см$^{-1}$): для гексана $E_{1см}^{1\%} = 2550$; для хлороформа $E_{1см}^{1\%} = 2592$;

10 – коэффициент пересчета в мг;

100 – пересчет на 100 г продукта;

К – коэффициент разбавления (К=1 для п.8.3.1. – 8.3.3. и п. 8.3.4. б); К=5 для п. 8.3.4. а)).

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений. Вычисления проводят до третьего знака после запятой и округляют до второго.

После проверки полученных результатов параллельных определений по критерию повторяемости по п.12 рассчитывают $\overline{X}$.

Результат анализа $\overline{X}$, рассчитывают по формуле (2):

$$\overline{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (2)$$

где X_1 – результат первого параллельного определения;

X_2 – результат второго параллельного определения;

Гарантированный результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\overline{X} \pm U(X)), \text{ мг/100 г}, \quad (3)$$

где $\overline{X}$ - среднее арифметическое из результатов измерений 2-х параллельных проб, полученное в соответствии с п.9 и рассчитанное согласно п.10;

$U(X)$ – абсолютное значение расширенной неопределенности результата измерений $\overline{X}$, мг/100 г. Рассчитывается по формуле:

$$U(X) = U \times 0{,}01 \times \overline{X}, \quad (4)$$

где U – относительное значение расширенной стандартной неопределенности, вычисленное в соответствии с Приложением Б

Если величина X оказывается меньше предела измерения методики (C_{LOQ}), то вычисления по п.10 не производятся, а дается односторонняя оценка массовой концентрации β-каротина в пробе в виде $X < (C_{LOQ})$, где C_{LOQ} – нижний предел измерения методики для группы продуктов:

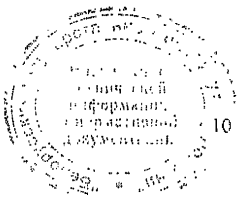
$$C_{LOQ} = \frac{10 \times 100 \times D_{\min} \times V}{E_{1см}^{1\%} \times m_{\max}} \times K, \quad (5)$$

где D_{min} =0,6375Б

11 Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют по форме, установленной действующей в лаборатории системой регистрации данных.

Результаты должны включать следующую информацию:



– Наименование (шифр) пробы;
– Дату проведения измерений;
– Результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
– Результаты параллельных определений;
– Окончательный результат измерений;
– Фамилию оператора.

12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости осуществляют согласно п. 5.2.2.1 СТБ ИСО 5725-6. Два результата испытаний должны быть получены в условиях повторяемости.

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами единичных наблюдений $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости $r_{абс.}$ Абсолютное значение предела повторяемости $r_{абс.}$, мг/100 г, рассчитывают по формуле

$$r_{абс} = 0{,}01 \cdot r \cdot \overline{X} \qquad (6)$$

где 0,01 – коэффициент для пересчета процентов;

$\overline{X}$ – среднее арифметическое значение двух результатов единичных наблюдений, мг/100 г;

r – относительное значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 2.

Если для значения абсолютного расхождения между двумя результатами единичных наблюдений выполняется условие

$$|X_1 - X_2| < r_{абс} \qquad (7)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\overline{X}$, рассчитанное по формуле (2).

Если абсолютное значение разности превышает значение r, то следует получить еще два результата. Если размах четырех результатов испытаний равен или меньше критического размаха (формула 7), то среднее арифметическое четырех результатов (9) должно указываться как конечный заявляемый результат.

$$|X_{max} - X_{min}| \leq CR_{0,95}, \qquad (8)$$

где $CR_{0,95} = 3{,}6 \times \sigma_r$ (9)

Значения σ_r представлены в таблице 1.

$$\overline{X}_{ок} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4}{4} \qquad (10)$$

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

Если данное условие не выполняется, то следует отказаться от полученных данных, выяснить и устранить причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

13 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, осуществляют согласно п. 5.3.2.2 СТБ ИСО 5725-6.

После проверки полученных результатов параллельных определений по критерию повторяемости по п.12 рассчитывают среднее арифметическое $\overline{\overline{X}}$ двух результатов измерений $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ соответственно, мг/100 г:

$$\overline{\overline{X}} = \frac{\overline{X}_1 + \overline{X}_2}{2}, \qquad (11)$$

где $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$ - средние значения, рассчитанные на основании двух параллельных измерений, вычисленные по формуле (2) в условиях внутрилабораторной воспроизводимости.

Рассчитывают абсолютную разность результатов $\overline{X}_1$ и $\overline{X}_2$, и сравнивают со значением предела внутрилабораторной воспроизводимости $CR_{абс}$.

$$CR_{абс} = 0{,}01 \cdot CR_{0,95} \cdot \overline{\overline{X}} \qquad (11)$$

где 0,01 – коэффициент для пересчета процентов;

$$CR_{0,95} = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}, \qquad (12)$$

где R и r - относительные значения пределов повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости, указанные в таблице 2.

Если для значения абсолютного расхождения между результатами выполняется условие

$$\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| < CR_{абс}, \qquad (13)$$

то оба конечных результата, полученные в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, считаются приемлемыми и среднее значение $\overline{\overline{X}}$, рассчитанное по формуле (11), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

При превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля внутрилабораторной воспроизводимости.

14 Проверка стабильности результатов измерений

Стабильность результатов измерений может быть проверена с использованием контрольной карты Шухарта (R-карта размахов по ИСО 8258) в соответствии с СТБ ИСО 5725-6 п.6.2.2.

При построении контрольной карты используют рабочие пробы стабильные во времени. Содержание β-каротина в рабочей пробе должно соответствовать диапазону измерений.

Рассчитывают:

- центральную линию: $d_2 \times \sigma_r$,

где $d_2 = 1{,}128$ (коэффициент для расчета центральной линии для n=2);

- границы регулирования: $UCL = D_2 \times \sigma_r$,

где $D_2 = 3{,}686$ (коэффициент для расчета границы регулирования для n=2);

- предупреждающие границы: $UCL = D_2(2) \times \sigma_r$,

где $D_2(2) = 2{,}834$ (коэффициент для расчета предупреждающих границ для n=2);

σ_r – стандартное отклонение повторяемости, % (таблица 1).

Оценку стандартного отклонения повторяемости s_r за отчетный период (20 – 30 измерений) получают по формуле:

$$s_r = \left(\frac{\sum_1^L w_i}{L} \right) / d_2 = \overline{w} / d_2 \quad , \qquad (14)$$

где $w_i = |X_{1i} - X_{2i}|$ - размах;

X_{1i} и X_{2i} – результаты первого и второго определения для i-ой пары, мг/100г;

L – количество пар проведенных измерений за отчетный период (20 - 30 измерений).

Полученные значения заносят в лист данных контрольной карты:

Дата проведения анализа	Наблюдаемые значения		Размах w	Описание
	X_1	X_2		
			Сумма	
			Среднее значение	$\overline{w}/d_2$

Графически по оси X откладывают дату проведения анализа, по оси Y – размах w. Также отмечают центральную линию и линии предупреждающей и регулирующей границ.

Интерпретацию результатов проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6-2002 п.6.

Методика разработана лабораторией химии пищевых продуктов отдела физико-химических исследований ГУ «РНПЦ гигиены» МЗ РБ.

Разработчики:

Зав. лабораторией ХПП, к.х.н. О.В. Шуляковская
Ст.н.с. лаборатории ХПП Л.Л. Бельшева
Мл.н.с. лаборатории ХПП Т.А. Гуринович

Республиканский научно-технической информации и нормативной документации

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(обязательное)

Нормативные ссылки

1 ГОСТ 15150-69 Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды.

2 ППБ 1.04 – 2002 Общие правила пожарной безопасности Республики Беларусь для общественных зданий и сооружений.

3 Основные правила безопасности работы в химических лабораториях/ – М.: Химия, 1979 г.

4 ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.

5 ГОСТ 12.2.003-91 Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.

6 СТБ 1036-97 Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.

7 СТБ ИСО 5725-6 -2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике (ISO 5725-6:1994/Соч.1 : 2001, IDT).

8 Р.Досон, Д.Эллиот, У.Эллиот, К.Джонс Справочник биохимика. М: «Мир», 1991. – С.196.

9 Скурихин В.Н., Шабаев С.В. Методы анализа витаминов А, Е, Д и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства. М.:Химия, 1996. – С.14.

10 Carotenoids as colorants vitamin A precursors. Technological and nutritional applications // Edited by J.C Bauernfeind. – New York: Academic Press, 1981. – P.883 – 918.

11 Гороновский, И.Т. Краткий справочник по химии / И.Т. Гороновский, Ю.П. Назаренко, Е.Ф. Некряч. – Киев, 1987. – 829 с.

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(обязательное)

Пример методики расчета неопределенности измерений.

1 Описание измеряемой величины

Измерение содержания β-каротина согласно МВИ включает следующие операции:

- Отбор навески анализируемой пробы;
- Проведение щелочного гидролиза;
- Экстракция органическим растворителем;
- Измерение точного объема разведения экстракта β-каротина в органическом растворителе;
- Измерение оптической плотности полученного экстракта на спектрофотометре.

Математическая модель измерений выражается соотношением:

$$X = \frac{10 \times 100 \times D \times V}{E_{1см}^{1\%} \times m \times \mathrm{Re}c} \times F_{\mathrm{Re}p}, \quad (1)$$

где D – оптическая плотность измеряемого раствора;

V – объем гексанового (хлороформенного) экстракта, см^3;

m – масса навески, г;

$E_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения для β-каротина в органическом растворителе:

для гексана $E_{1см}^{1\%} = 2550$; для хлороформа $E_{1см}^{1\%} = 2592$;

10 – коэффициент пересчета в мг;

100 – пересчет на 100 г продукта;

Rec – степень извлечения;

F_{Rep} – фактор сходимости

Исходя из полученной модели, неопределенность измеренной массовой концентрации β-каротина включает следующие основные составляющие:

а) неопределенность, обусловленную случайными факторами (фактор сходимости);

б) неопределенность, обусловленную смещением метода;

в) другие составляющие неопределенности, не учтенные при исследовании прецизионности и смещения.

2 Оценивание относительнои стандартной неопределенности, обусловленной случайными факторами

Учитывая, что результат измерения получают усреднением результатов двух параллельных определений, оценку относительной стандартной неопределенности (ОСН) для каждого диапазона рассчитывают по формуле:

Отдел научно-технической информации и нормативной документации

$$u_c = \frac{\sigma_r}{\sqrt{2}}, \qquad (2)$$

где σ_r – показатель повторяемости (таблица 1 МВИ).

3 Оценивание относительной стандартной неопределенности, обусловленной смещением метода

При метрологической аттестации методики установлено, что максимальное значение неопределенности, обусловленной смещением следующее:

$$u(\overline{\mathrm{Re}\,c})\,\% = \mathbf{0{,}02}$$

4 Оценивание других составляющих неопределенности

К другим составляющим неопределенности выполнения измерений относятся: а) неопределенность, связанная с неопределенностью удельного поглощения β-каротина; б) неопределенность, связанная с обработкой пробы; в) неопределенность связанная с погрешностью измерения оптической плотности спектрофотометром.

1) Для оценки неопределенности связанной, с неопределенностью удельного поглощения β-каротина, можно воспользоваться данными, полученными в результате проведения метрологичекой аттестации методики (таблица 1 Приложения Б). Представленные значения оценены на основании исследования зависимости D=f(C).

Таблица 1 – Результаты исследований относительной стандартной неопределенности удельного поглощения β-каротина, оцененной на основании исследования зависимости D=f(C)

x_i, мкг/см^3	u_{rx}, %	u_{xi}, %	$u_{E^{1\%}_{1см}}$, %
0,25	5,5	4,1	**7,0**
0,50	2,7	2,0	**3,4**
2,00	0,7	0,5	**0,9**
4,00	0,4	0,3	**0,5**
7,60	0,2	0,13	**0,3**

Как видно из таблицы 1 приложения Б, неопределенность удельного поглощения вносит большой вклад в бюджет неопределенности измерений. Это значение существенно зависит от концентрации β-каротина в спектрофотометрируемом объеме. Данный факт необходимо учитывать при вычислении неопределенности отдельного измерения и стремиться к проведению измерений в середине диапазона измеряемых концентраций 0,25 - 7,00 мкг/см^3.

2) Математическая модель измерения включает составляющие неопределенности, связанные с взвешиванием пробы, взятой для анализа и измерением объема органического растворителя для растворения экстракта β-каротина *(u_n)*.

Значение u_n составляет:

$$u_n = \sqrt{u_m^2 + u_V^2}, \qquad (3)$$

где u_m – ОСН, связанная с взвешиванием пробы и учетом тарирования весов при взвешивании навески:

$$u_{m(отн)} = \frac{u_{весы}}{m} \times 100\%, \quad (4)$$

$$u_{весы} = \frac{\Delta}{\sqrt{3}} \times \sqrt{2} \quad (5)$$

где m – масса навески, мг;

Δ - погрешность весов, мг

u_V – ОСН, связанная с измерением объема органического растворителя для растворения экстракта β-каротина.

$$u(V) = \sqrt{u^2(V_o) + u^2(V_t)} \quad (6)$$

где $u(V_o)$ и $u(V_t)$ - стандартная неопределенность, возникающая из-за отклонения объема мерной колбы от номинальной вместимости при ее изготовлении;

$$u(V_o) = \frac{\Delta_V}{\sqrt{6}}, \quad (7)$$

где Δ_V – погрешность колбы (пипетки)

$$u(V_t) = \frac{0{,}001445 \times 5 \times V}{\sqrt{3}}, \quad (8)$$

где 0,001445 – коэффициент объемного расширения для гексана (для хлороформа – 0,001273);

5 – пределы колебания температуры в лаборатории во время проведения исследований;

V – объем мерной колбы (пипетки).

Кроме того, учитывается неопределенность, связанная с погрешностью определения оптической плотности спектрофотометром (данные, указанные в свидетельстве о поверке прибора).

В таблице 2 приложения Б представлен бюджет неопределенности измерений, составленный из максимальных значений, полученных при метрологической аттестации методики.

Таблица 2 - Бюджет неопределенности измерений

Источник неопределенности	Тип оценки	Относительная стандартная неопределенность, %			
Диапазон измерений, мг/100 г			0,01-1,00 вкл.	св. 1,00 - 10,00 вкл.	св. 10,00-2000,00 вкл.
Повторяемость результатов измерений массовой концентрации каротин в пробе	А	u_c	3,6	1,8	0,3
Обработка пробы	В	$u_п$	0,65	0,65	0,65
Смещение	А	u(Rec)	0,02	0,02	0,003
Удельное поглощение	А	$u_{E^{1\%}_{1cm}}$	7,0	7,0	7,0
Измерение оптической плотности	В	$u_{сф}$	1,16	1,16	1,16
Суммарная стандартная неопределенность*)		u	**8,0**	**7,4**	**7,1**
Расширенная неопределенность (k=2)		U	**16,0**	**14,8**	**14,2**
Принято:		**U**	**16,0**	**15,0**	**14,0**

*) Суммарная стандартная неопределенность вычисляется по формуле: $u = \sqrt{\sum u_i^2}$

gost.e-ecolog.ru

Отдел научно-технической и нормативной документации