МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ

СОГЛАСОВАНО

Зам. директора Бел ГИМ

_____А. Коломиец

«__» _____ 2010г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный врач Республики
Беларусь

_____В.И. Качан

«08» 08 2010г.

МЕТОДИКА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРОЗАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

МВИ.МН 3543-2010

МВИ аттестована
РУП "Белорусский государственный
институт метрологии"
Свидетельство об аттестации
№ 585/2010
от "24" 08 2010 г.

Директор ГУ «РНПЦ гигиены»
профессор

_____В.П. Филонов

_____2010г.

Минск 2010

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ

СОГЛАСОВАНО

Зам. директора Бел ГИМ

_____Т.А. Коломиец

«___» _____ 2010г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный врач Республики Беларусь

_____В.И. Качан

«___» _____ 2010г.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРОЗАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

МВИ МН - 2010

Директор ГУ «РНПЦ гигиены»
профессор

_____ В.П. Филонов

_____ 2010г.

Минск 2010

1 Область применения

Настоящий документ «Методика определения нитрозаминов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом высокоэффективной жидкостной хроматографии» устанавливает методику выполнения измерений массовой концентрации (далее - концентрация) суммы летучих нитрозаминов (далее - НА) – диметилнитрозамина (далее - ДМНА) и диэтилнитрозамина (далее - ДЭНА) – в пищевых продуктах (мясных и колбасных изделиях, в рыбе и рыбных изделиях, в детском питании на основе мясных, рыбных и мучных продуктов) и продовольственном сырье (в зерне, сыром мясе, рыбе) методом жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором.

Методика предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, для научно-исследовательских и других заинтересованных организаций.

Диметилнитрозамин – маслянистая жидкость, плотность (далее – d^{18}) 1,01, температура кипения 152- 153^{O}C, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. Структурная формула - $(CH_3)_2N$ - N=0, молекулярная масса – 74,08.

Диэтилнитрозамин – маслянистая жидкость, d^{20} 0,95, температура кипения – 176,9^{O}C, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. Структурная формула - $(C_2H_5)_2N$ - N=0, молекулярная масса – 102,13.

ДМНА и ДЭНА обладают широким спектром токсического действия и могут вызывать опухоли различной локализации.

В соответствии с Санитарными нормами, правилами и гигиеническими нормативами «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденными Постановлением Министерства Здравоохранения от 09 июня 2009 г. № 63, предельно допустимая концентрация (ПДК) НА в мясе, мясных изделиях, колбасах – не более 0,002 мг/кг, в копчениостях – не более 0,004 мг/кг, в рыбе свежей и пиве – не более 0,003 мг/кг, в продуктах для детского питания – не допускается при чувствительности метода 0,001 мг/кг, в зерне (пивной солод) – не более 0,015 мг/кг. [1]

Метод основан на выделении НА перегонкой с водяным паром и экстракции органическим растворителем, денитрозировании НА бромистым водородом в уксусной кислоте до соответствующих аминов, получении производных аминов с 5-(диметиламино)-нафталин-1-сульфохлоридом (далее - дансилхлоридом), хроматографическом разделении и количественном определении образовавшихся производных методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектором.

Нижний предел измерения настоящей методики составляет 0,0005 мг/кг для ДМНА и 0,00075 мг/кг для ДЭНА.

Идентификация дансилпроизводных НА производится по временам удерживания, а количественное определение содержания ДМНА и ДЭНА – методом внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта применяется дипропилнитрозамин (далее - ДПНА), который соответствует требованиям, предъявляемым к выбору внутреннего стандарта при количественном анализе методом жидкостной хроматографии и является наиболее приемлемым для надежного результата. [2]

2 Показатели прецизионности методики

Относительные значения показателей прецизионности МВИ (повторяемости и промежуточной прецизионности) при доверительной вероятности Р−95 % представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Пределы измерений и относительные значения показателей прецизионности МВИ (доверительная вероятность $P = 95\,\%$)

НА	Диапазон измерений, мг/кг	Нижний предел измерений X_{LOQ}, мг/кг	Относительное стандартное отклонение		Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) r, %	Предел промежуточной прецизионности (для двух результатов измерений) $r_{I(IO)}$, %
			повторяемости S_r, %	промежуточной прецизионности $S_{I(IO)}$, %		
ДМНА	От 0,0005 до 0,5000 включ.	0,0005	6,3	6,5	17,6	18,2
ДЭНА	От 0,00075 до 0,75000 включ.	0,00075	5,9	6,5	16,5	18,2

При использовании МВИ должна производиться оценка показателя правильности (определение лабораторного смещения) в соответствии с СТБ ИСО 5725-4 и оценка неопределенности измерений при ее реализации в конкретной лаборатории.

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Высокоэффективный жидкостной хроматограф, включающий: – насос с вакуумным дегазатором – термостат колонок – флюориметрический детектор – систему управления и обработки данных	Agilent 1100
Весы лабораторные электронные с точностью взвешивания 0,0001г, Adventurer AR2140	Фирма Ohaus
Микрошприц для хроматографа, «Hamilton» 50мкл, цена деления 1 мкл	фирма «Sigma-Aldrich», производитель USA
Пипетка 2 кл. точности 0,1 см^3, цена деления 0,002 см^3	ГОСТ 20292-74
Пипетки 1-1-1-1 1-1-1-2 1-1-1-5 1-1-1-10	ГОСТ 29227-91
Колба мерная 2-(50,100,200,250,500,1000)-2	ГОСТ 1770-74
Цилиндр мерный 3-(50,1000)-1	ГОСТ 1770-74
Пробирка со шлифом П-2-(5,10) 14/23 ХС	ГОСТ 1770-74

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Кондиционер H 07 ZP	Фирма Samsung
Водяная баня HB4 digital	Фирма IKA
Баня песчаная	
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М	ТУ 25-11-917-74
Баня водяная	ТУ 64-1-423-72
Воронки ВД-1-500	ГОСТ 25336-82

Воронки конические, стеклянные диаметром 30-33 мм	ГОСТ 25336-82
Колба $К_г$-50-14/23 ТС	ГОСТ 25336-82
Колба К-1-250–29/32 ТС	ГОСТ 25336-82
Мясорубка и измельчитель	
Фарфоровые чашки для выпаривания (диаметр 55 мм, объем 20 $см^3$)	
УФ-лампа ОКН-11	ТУ 84-1-1618-77
Холодильник с морозильной камерой	
Система для фильтрования и дегазации элюента	

Могут быть использованы другие средства измерений и вспомогательные устройства, по точности, не уступающие рекомендованным в методике.

3.3 Реактивы и материалы

Колонка для жидкостной хроматографии металлическая (250x4,6) Eclipse XDB-C18, 5мкм	фирма «Agilent» № 990967-902
Диметилнитрозамин, ρ=1,01 г/$см^3$	фирма «Sigma», каталожный № N 7756
Диэтилнитрозамин, ρ=0,95 г/$см^3$	фирма «Sigma», каталожный № N 0756
Дипропилнитрозамин, 100мг	фирма «Supelko», каталожный № 48554
Метанол для ВЭЖХ ≥99,9%	фирма «Fluka»
Ацетон для ВЭЖХ ≥99,8%	фирма «Sigma-Aldrich»
Ацетонитрил для ВЭЖХ ≥99,9%	фирма «Sigma-Aldrich»
Бензол, ≥99,5% для ВЭЖХ	фирма «Fluka»
Кислота уксусная, ≥99%	фирма «Sigma-Aldrich»
Бромистый водород в уксусной кислоте, ≥33%	фирма «Sigma-Aldrich» каталожный №18735
Хлористый метилен, для ВЭЖХ	фирма «Merck»
Натрий сернокислый безводный, ≥99,0%	фирма «Sigma-Aldrich»
Дансилхлорид, 95%	фирма «Sigma», каталожный № D2625-1г
Кислота серная, 95-98%	фирма «Sigma-Aldrich»
Натрия гидроокись, ≥98%	фирма «Sigma-Aldrich»
Натрий углекислый кислый, 99,7-100,3%.	фирма «Sigma-Aldrich»
Сульфаминовая или сульфаниловая кислота, ≥99,0%	фирма «Sigma-Aldrich»
Натрий хлористый, ≥99,5%	фирма «Sigma-Aldrich»
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Фильтры бумажные, «синяя лента»	ТУ-6-09-1678-86
Фильтры из регенерированной целлюлозы, диаметром 47 мм с размером пор 0,45 мкм	фирма «Agilent» № 3150-0576

Могут быть использованы реактивы и материалы по техническим характеристикам не хуже указанных выше.

4 Метод измерения

В соответствии с данной МВИ измерения производятся методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием после следующих этапов пробоподготовки:

- перегонка с водяным паром нитрозаминов;

- экстракция из водной среды в органический растворитель;
- получение аминов – денитрозирование;
- удаление органического растворителя и упаривание досуха;
- получение дансилпроизводных аминов;
- переэкстракция дансилпроизводных из водно-ацетоновой среды в органический растворитель;
- удаление органического растворителя;
- хроматографирование полученных дансилпроизводных

5 Требования безопасности

Помещение, в котором производится определение НА, обязательно должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

Работу с НА следует проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты (очки, перчатки и др.).

В лаборатории, где проводится работа с канцерогенными летучими НА, всегда должен быть в наличии 3,3% раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте для разрушения НА при попадании их на рабочие места и пол. По окончании работы в целях разрушения летучих НА в воздухе помещение необходимо обработать УФ-светом в течение 30 минут.

Транспортировка и хранение НА осуществляется в стеклянных запаянных ампулах, обернутых в асбестовую ткань и упакованных в металлическую тару, оплавленную парафином.

НА хранят в отдельном холодильнике в отсутствие анализируемых проб.

6 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке результатов хроматографического анализа могут быть допущены лица, имеющие высшее специальное образование, опыт работы в области жидкостной хроматографии, изучившие требования безопасности и настоящую методику, руководство по эксплуатации жидкостного хроматографа, инструкцию по использованию системы обработки хроматографических данных.

7 Условия выполнения измерений

Выполнение измерений в лаборатории по настоящей методике осуществляется при следующих условиях:

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных (20±2) ^{O}C;
- температура воздуха при измерении (20±5) ^{O}C;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа;
- влажность воздуха (65±15)% при температуре 25 ^{O}C;
- напряжение питающей сети (230 ± 10) В;
- частота переменного тока (50 ± 0,4) Гц.

Выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводятся в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору и настоящей методикой.

8 Подготовка к выполнению измерений

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

8.1 Подготовка измерительной аппаратуры

Жидкостной хроматограф подготавливают к работе согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для колонки и детектора. Для дегазации колбу с элюентом помещают на водяную баню при температуре 40-50 °С, открыв при этом пробку. После охлаждения колбы до комнатной температуры подвижная фаза готова к применению. Элюент должен быть всегда закрыт пробкой и храниться в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Раствор дансилхлорида с концентрацией 0,5 мг см^3.

Навеску дансилхлорида массой 26,5 мг помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и растворяют в 20 см^3 ацетона, доводят до метки ацетоном. Готовый раствор хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С, тщательно предохраняя от попадания влаги. Срок хранения – не более 3 месяцев.

8.2.2 3,3 %-ный раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте (денитрозирующий раствор)

В коническую колбу вместительностью 50 см^3 вносят 5 см^3 33%-ного бромистого водорода в уксусной кислоте и добавляют 45 см^3 ледяной уксусной кислоты. Смесь хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в посуде из темного стекла. Срок хранения – не более 1 месяца. Признаком непригодности для использования раствора является появление желто-коричневой окраски.

8.2.3 Буферный раствор с pH – 10,5

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 помещают 3,2 г NaOH и вливают 200 см^3 дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения щелочи, добавляют 20,0 г $NaHCO_3$. Тщательно перемешивают раствор до полного растворения соли, доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Хранят раствор в полиэтиленовой посуде. Срок хранения – 3 месяца.

8.2.4 1 н раствор серной кислоты

В мерную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 200 см^3 дистиллированной воды. Добавляют 6,7 см^3 концентрированной серной кислоты (плотностью 1,98 г/см^3), перемешивают, охлаждают до комнатной температуры. Доводят объем до метки дистиллированной водой. Срок хранения не ограничен.

8.2.5 Рабочий раствор ДМНА с концентрацией 10,1 мг см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 20 см^3 метилового спирта. Добавляют 1 см^3 ДМНА (кат. № 7756) пипеткой вместимостью 1 см^3 и доводят объем до

метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 года.

8.2.5.1 Рабочий раствор ДМНА с концентрацией 101 мкг см³

В мерную колбу вместимостью 10 см³ помещают 20 см³ метилового спирта. Добавляют 1 см³ ДМНА (п. 8.2.5.) пипеткой вместимостью 1 см³ и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 года.

8.2.6 Рабочий раствор ДЭНА с концентрацией 9,5 мг см³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 20 см³ метилового спирта. Добавляют 1 см³ ДЭНА (кат. № 0756) пипеткой вместимостью 1 см³ и доводят объем до метки метиловым спиртом. Раствор перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 года.

8.2.6.1 Рабочий раствор ДЭНА с концентрацией 95 мкг см³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 20 см³ метилового спирта. Добавляют 1 см³ рабочего раствора ДЭНА (п. 8.2.6) пипеткой вместимостью 1 см³ и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 года.

8.2.7 Рабочий раствор ДПНА с концентрацией 400 мкг см³

В мерную колбу вместимостью 250 см³ количественно переносят образец ДПНА массой 100 мг (кат. № 48554), растворяя его в метиловом спирте, и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 года.

8.2.7.1 Рабочий раствор ДПНА с концентрацией 2 мкг см³ (внутренний стандарт)

В мерную колбу вместимостью 200 см³ вносят 1 см³ рабочего раствора ДПНА с концентрацией 400 мкг/см³ пипеткой вместимостью 1 см³, затем добавляют 20 см³ метилового спирта, тщательно перемешивают и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С не более 6 месяцев.

8.2.8 Подвижная фаза для жидкостного хроматографа – смесь ацетонитрил : вода (7:3)

В случае отсутствия дегазатора в составе жидкостного хроматографа приготовление элюента производят следующим образом. В коническую колбу вместимостью 1000 см³ наливают 700 см³ ацетонитрила. Добавляют 300 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают и дегазируют. Для дегазации колбу с элюентом помещают на водяную баню при температуре 40-50 °С, открыв при этом пробку. После охлаждения колбы с элюентом до комнатной температуры, элюент фильтруют через систему для фильтрования и дегазации, после чего подвижная фаза готова к применению. Элюент храниться в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в закрытой посуде. Срок хранения не ограничен.

8.2.9 Приготовление градуировочных растворов

8.2.9.1 Приготовление основного раствора смеси ДМНА и ДЭНА с концентрациями 0,303 мкг/см³ и 0,456 мкг/см³ соответственно

В мерной колбе вместимостью 1000 см³ с притертой пробкой смешивают 3,0 см³ раствора ДМНА (по п. 8.2.5.1), 4,8 см³ ДЭНА (по п. 8.2.6.1) отмеренные пипетками вместимостью 5 см³ и доводят объем до метки метиловым спиртом. Раствор перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С не более 6 месяцев.

8.2.9.2 Выделение НА путем отгонки с водяным паром

В колбу для перегонки вместимостью 500 см³, соединенную с паровиком и прямым холодильником в соответствии с рисунком, приведенным в приложении А, помещают 250 см³ дистиллированной воды, добавляют основной раствор смеси ДМНА и ДЭНА (п. 8.2.9.1), а также рабочий раствор ДПНА (п. 8.2.7.1) в количествах, указанных в таблице 2. К смеси добавляют 10 г сульфата натрия, 1 г сульфаминовой кислоты, 10 г хлорида натрия, 10 см³ 1 н раствора серной кислоты. Смесь перемешивают, подсоединяют колбу к системе и отгоняют НА с водяным паром, собирая 250 см³ дистиллята в колбу вместимостью 250 см³.

Данную процедуру проводят для каждого градуировочного раствора, добавляя основной раствор смеси ДМНА и ДЭНА (п. 8.2.9.1) и рабочий раствор ДПНА (п. 8.2.7.1) в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 – Приготовление градуировочных растворов.

№ градуировочного раствора	Объем смеси ДМНА и ДЭНА, см³	Объем рабочего раствора ДПНА, см³
1	0,17	1
2	0,83	1
3	3,30	1
4	6,60	1
5	10,00	1

8.2.9.3 Экстракция НА из дистиллята

Каждые 250 см³ дистиллята, полученного по п. 8.2.9.2 помещают в делительную воронку вместимостью 500 см³, колбу ополаскивают 20 см³ хлористого метилена, который затем сливают в делительную воронку с дистиллятом, смесь интенсивно встряхивают в течении 5 мин и оставляют до четкого расслаивания фаз. Экстракцию хлористым метиленом повторяют еще дважды порциями по 20 см³. Каждую порцию экстракта в хлористом метилене сливают через воронку с бумажным фильтром, заполненную 5 г безводного сульфата натрия или сульфата магния в колбу для отгонки на 100 см³. Фильтр с сульфатом натрия промывают 10 см³ экстрагента.

8.2.9.4 Получение дансилпроизводных НА.

В осушенный экстракт добавляют 2 см³ 3,3 %-ного раствора бромистого водорода в уксусной кислоте, приготовленного по п. 8.2.2., перемешивают и оставляют для процесса

денитрозирования не менее чем на 30 минут при комнатной температуре. Упаривают хлористый метилен на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 30°С приблизительно до 2 см^3. Полученный экстракт количественно переносят в фарфоровую чашку, колбу для упаривания омывают 0,5 см^3 уксусной кислоты и присоединяют к содержимому фарфоровой чашки. Экстракт осторожно упаривают на песчаной бане при температуре не более 120°С досуха.

Чашку с сухим остатком охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения в фарфоровую чашку пипеткой вместимостью 1 см^3 добавляют 0,6 см^3 буферного раствора (п. 8.2.3.) и круговыми движениями растворяют сухой остаток. К полученному экстракту при помощи пипетки вместимостью 1 см^3 добавляют 0,8 см^3 раствора дансилхлорида, приготовленного по п. 8.2.1., перемешивают и немедленно переносят смесь в пробирку с притертой пробкой вместимостью 5 см^3. Плотно закрытую пробирку помещают в водяную баню с температурой 55°С не менее чем на 40 мин для прохождения процесса получения дансил-производных.

Затем пробирку извлекают из водяной бани и охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору добавляют 1 см^3 бензола, интенсивно встряхивают в течении 5 мин и оставляют до момента четкого разделения фаз. Из верхнего прозрачного бензольно-ацетонового слоя пипеткой вместимостью 2,0 см^3 отбирают прозрачный экстракт и переносят в сухую пробирку вместимостью 5 см^3 с пришлифованной пробкой. После этого экстракцию бензолом повторяют еще раз и снова отбирают прозрачный бензольно-ацетоновый экстракт, объединяя его с первой порцией. Суммарный объем растворителей из экстракта отдувают в токе азота досуха строго в вытяжном шкафу. К полученному сухому остатку добавляют 1 см^3 подвижной фазы, плотно закрывают и растворяют сухой остаток путем интенсивного встряхивания.

Вышеизложенным способом готовят пять серий растворов в соответствии с таблицей № 2 в трех повторностях для каждой концентрации.

В таблице 3 приведена концентрация НА, присутствующих в виде дансил-производных, в полученных градуировочных растворах.

Полученные растворы дансил-производных ДМНА, ДЭНА и ДПНА хранятся в холодильнике в течении 20 дней при температуре 4-5 °С. После истечения 20 дней, если растворы имеют отклонения от первоначальных показателей в соответствии с п. 8.3.2 и п. 9.1, то они не подлежат дальнейшему использованию и их готовят заново.

Таблица 3 – Концентрация НА в градуировочных растворах

№ градуировочного раствора	Концентрация НА, мкг/см^3		
	ДМНА	ДЭНА	ДПНА
1	0,05	0,08	2,00
2	0,25	0,38	2,00
3	1,00	1,50	2,00
4	2,00	3,01	2,00
5	3,03	4,56	2,00

8.2.9.5 Проверка используемых реактивов на чистоту (холостая проба).

Перед проведением расчетов необходимо провести проверку используемых реактивов на чистоту (проводится для одной пробы). Для этого в колбу для перегонки вместимостью 500 см^3, соединенную с паровиком и прямым холодильником в соответствии с рисунком, приведенным в приложении А, помещают 250 см^3

дистиллированной воды, добавляют рабочий раствор ДПНА (п. 8.2.7.1). К смеси добавляют 10 г сульфата натрия, 1 г сульфаминовой кислоты, 10 г хлорида натрия, 10 $см^3$ 1 н раствора серной кислоты. Смесь перемешивают, подсоединяют колбу к системе и отгоняют НА с водяным паром, собирая 250 $см^3$ дистиллята в колбу вместимостью 250 $см^3$. Далее действуют в соответствии с п. 8.2.9.3, п. 8.2.9.4.

8.3 Установление градуировочной характеристики

8.3.1. Условия хроматографирования

Хроматографирование градуировочных растворов и холостой пробы проводят на жидкостном хроматографе с флуоресцентным детектором; при следующих условиях:

- колонка из нержавеющей стали (250 х 4,6 мм), заполненная сорбентом Eclipse XDB-C18, размер частиц 5 мкм;
- температура колонки 30 ^{O}C;
- подвижная фаза – смесь ацетоннитрил-вода в объемном соответствии 7:3,
- скорость элюирования – 1,2 $см^3$/мин;
- длина волны возбуждения – 350 нм;
- эмиссионный фильтр – 530 нм;
- коэффициент усиления ФЭУ – 10;
- ширина пика > 0,2 мин, постоянная отклика 4 с;
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- время удерживания дансилпроизводных НА устанавливают по градуировочным растворам при вышеприведенных условиях хроматографии.

8.3.2. Расчет относительного градуировочного коэффициента

Для расчета относительного градуировочного коэффициента каждого определяемого НА используют градуировочные растворы, приготовленные в соответствии с п. 8.2.9.2-8.2.9.4 и холостую пробу. Для этого аликвотную часть 0,020 $см^3$ каждого градуировочного раствора вводят в инжектор жидкостного хроматографа. Регистрируют площади пиков ДМНА и ДЭНА и внутреннего стандарта. Хроматографирование каждого градуировочного раствора и холостой пробы проводят трижды.

Рассчитывают относительные градуировочные коэффициенты $\overline{K}_{i\,отн}$ для каждой концентрации ДМНА и ДЭНА относительно внутреннего стандарта с концентрацией 2,00 мкг/$см^3$ по формулам (1) – (6), средние значения коэффициентов $\overline{\overline{K}}_{отн}$ рассчитывают по формулам (7), (8) для каждого определяемого НА (ДМНА и ДЭНА) во всем диапазоне измерений.

$$\overline{S}_{ДМНАхол} = \frac{\sum_{j=1}^{3} S_{jДМНАхол}}{3}, \qquad (1)$$

где

$\overline{S}_{ДМНАхол}$ - средняя площадь пика ДМНА в холостой пробе;

$S_{jДМНАхол}$ - площадь пика ДМНА при j-ом измерении холостой пробы.

$$\overline{S}_{ДЭНАхол} = \frac{\sum_{j=1}^{3} S_{jДЭНАхол}}{3} \qquad (2)$$

$\overline{S}_{ДЭНАхол}$ - средняя площадь пика ДЭНА в холостой пробе;

$S_{jДЭНАхол}$ - площадь пика ДЭНА при j-ом измерении холостой пробы.

$$K_{ijотнДМНА} = \frac{C_{iДМНА} \cdot S_{ijвн.ст}}{C_{вн.ст} \cdot \left(S_{ijДМНА} - \overline{S}_{ДМНАхол}\right)} \quad (3)$$

где

$K_{ijотнДМНА}$ - относительный градуировочный коэффициент для i-го раствора ДМНА, по результатам j-го измерения;

$C_{iДМНА}$ - концентрация ДМНА в i-ом градуировочном растворе (таблица 3), мкг/см^3;

$S_{ijДМНА}$ - площадь пика ДМНА по результатам j-го измерения i-го градуировочного раствора;

$C_{вн.ст}$ - концентрация внутреннего стандарта (ДПНА) в i-ом градуировочном растворе, мкг/см^3 ,($C_{вн.ст}$=2,00 мкг/см^3);

$S_{ijвн.ст}$ - площадь пика внутреннего стандарта (ДПНА) по результатам j-го измерения i-го градуировочного раствора;

$$\overline{K}_{iотнДМНА} = \frac{\sum_{j=1}^{9} K_{ijотнДМНА}}{9} \quad (4)$$

где

$\overline{K}_{iотнДМНА}$ - среднее значение относительного градуировочного коэффициента для концентрации ДМНА в i-ом градуировочном растворе.

Аналогично рассчитывают относительный градуировочный коэффициент $\overline{K}_{iДЭНА}$ концентрации ДЭНА в i-ом градуировочном растворе.

$$K_{ijотнДЭНА} = \frac{C_{iДЭНА} \cdot S_{ijвн.ст}}{C_{вн.ст} \cdot \left(S_{ijДЭНА} - \overline{S}_{ДЭНАхол}\right)} \quad (5)$$

где

$K_{ijотнДЭНА}$ - относительный градуировочный коэффициент для i-го раствора ДЭНА, по результатам j-го измерения;

$C_{iДЭНА}$ - концентрация ДЭНА в i-ом градуировочном растворе (таблица 3), мкг/см^3;

$S_{ijДЭНА}$ - площадь пика ДЭНА по результатам j-го измерения i-го градуировочного раствора;

$C_{вн.ст}$ - концентрация внутреннего стандарта (ДПНА) в i-ом градуировочном растворе, мкг/см^3 ,($C_{вн.ст}$=2,00 мкг/см^3);

$S_{ijвн.ст}$ - площадь пика внутреннего стандарта (ДПНА) по результатам j-го измерения i-го градуировочного раствора;

$$\overline{K}_{iотнДЭНА} = \frac{\sum_{j=1}^{9} K_{ijотнДЭНА}}{9} \quad (6)$$

где

$\overline{K}_{iотнДЭНА}$ - среднее значение относительного градуировочного коэффициента для концентрации ДЭНА в i-ом градуировочном растворе.

$$\overline{\overline{K}}_{отнДМНА} = \frac{\sum_{i=1}^{5} \overline{K}_{iотнДМНА}}{5} \quad (7)$$

$\overline{\overline{K}}_{отнДМНА}$ - среднее значение относительного градуировочного коэффициента для ДМНА по всему диапазону концентраций;

$$\overline{\overline{K}}_{отнДЭНА} = \frac{\sum_{i=1}^{5} K_{iотнДЭНА}}{5} \quad (8)$$

$\overline{\overline{K}}_{отнДЭНА}$ - среднее значение относительного градуировочного коэффициента для ДЭНА по всему диапазону концентраций;

8.4 Отбор проб для анализа

Отбор проб производят в соответствии с СТБ 1036. Масса средней пробы пищевого продукта или продовольственного сырья должна быть не менее 1 кг.

Отобранные пробы хранят в морозильной камере при температуре от минус 8 °С до минус 18 °С.

9 Проведение анализа

Перед проведением анализа испытуемого образца должны быть выполнены следующие этапы:

1) Проверка стабильности градуировочного коэффеициента
2) Проверка на чистоту реактивов (контроль холостой пробы)
3) Приготовление испытуемой пробы
4) Приготовление пробы с добавкой

9.1 Проверка стабильности градуировочного коэффициента

Для контроля стабильности градуировочного коэффициента перед проведением анализа испытуемых образцов в инжектор хроматографа однократно вводят градуировочные растворы № 2 и 4 (в соответствии с таблицей 3), приготовленные по пп. 8.2.9.2-8.2.9.4 и холостую пробу. После этого рассчитывают $K_{практДМН.1}$ и $K_{практДЭН.1}$ по формулам (3), (5). Отклонение относительных градуировочных коэффициентов для ДМНА и ДЭНА в каждом из растворов от значений, полученных при расчете относительного градуировочного коэффициента по п. 8.3.2 не должно превышать 10 % для каждого определяемого НА.

$$\frac{\left|\overline{\overline{K}}_{отн} - \overline{K}_{практ}\right|}{\overline{\overline{K}}_{отн}} \cdot 100 \le 10\%, \quad (9)$$

где

$\overline{\overline{K}}_{отн}$ - среднее значение относительного градуировочного коэффициента ДМНА или ДЭНА, полученное при расчете по п.8.3.2.

$\overline{K}_{практ}$ - значение относительного градуировочного коэффициента ДМНА или ДЭНА, полученное при проверке градуировочного коэффициента.

В случае получения значения относительного градуировочного коэффициента, отличающегося более чем на 10,0% для любого определяемого НА необходимо принять меры по устранению причин невыполнения условия (9).

9.2 Контроль холостой пробы

Проверку на чистоту реактивов (контроль холостой пробы) проводят при использовании новой партии реактивов в соответствии с п. 8.2.9.5, полученный раствор хроматографируют дважды. Концентрации ДМНА и ДЭНА в холостой пробе, рассчитанные по п. 10.1.1, 10.1.2, не должны превышать соответственно 0,0010 мг/кг и 0,00075 мг/кг. В случае превышения указанных пределов необходимо принять меры по очистке используемых реактивов, либо заменить реактивы. В случае, если сумма концентраций определяемых НА в холостой пробе не превышает 0,0001 мг/кг, то при расчете результатов измерений содержание НА в холостой пробе допускается не учитывать.

9.3 Приготовление испытуемой пробы

9.3.1 Выделение НА путем отгонки с водяным паром

Среднюю пробу в количестве 1 кг измельчают, хорошо перемешивают и из полученной пробы отбирают 2 навески по 100 г (взвешенные с точностью 0,1 г). Каждую навеску помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 $см^3$. К навеске добавляют 150 $см^3$ дистиллированной воды и при помощи пипетки вместимостью 1 $см^3$ вносят раствор ДПНА концентрацией 2 мкг/$см^3$ (п. 8.2.7.1) в количестве 1 $см^3$. В полученную смесь добавляют 10 г хлорида натрия, 10 г сульфата натрия, 1 г сульфаниловой кислоты, 10 $см^3$ 1 н раствора серной кислоты. Смесь перемешивают, колбу устанавливают в систему для отгонки НА с водяным паром, собирют 200-250 $см^3$ дистиллята. Схема прибора для перегонки с водяным паром приведена в приложении А.

9.3.2 Экстракция НА из дистиллята

200-250 $см^3$ дистиллята, полученного по п.9.3.1 помещают в делительную воронку на 500 $см^3$, колбу ополаскивают 20 $см^3$ хлористого метилена, который затем сливают в делительную воронку с дистиллятом, смесь интенсивно встряхивают в течении 5 мин и оставляют до четкого расслаивания фаз. Экстракцию хлористым метиленом повторяют еще дважды порциями по 20 $см^3$. Каждую порцию экстракта в хлористом метилене сливают через воронку с бумажным фильтром, заполненную 5 г безводного сульфата натрия или сульфата магния в колбу для отгонки на 100 $см^3$. Фильтр с сульфатом натрия промывают 10 $см^3$ экстрагента. Далее в осушенный экстракт добавляют 2 $см^3$ 3,3%-ного раствора бромистого водорода в уксусной кислоте, приготовленного по п. 8.2.2., перемешивают и оставляют для процесса денитрозирования не менее чем на 30 мин при комнатной температуре. Упаривают хлористый метилен на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 30°С. Полученный экстракт количественно переносят в фарфоровую чашку, колбу для упаривания омывают 0,5 $см^3$ уксусной кислоты и присоединяют к содержимому фарфоровой чашки. Экстракт осторожно упаривают на песчаной бане при температуре не более 120°С досуха.

Чашку с сухим остатком охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения в фарфоровую чашку добавляют 0,6 $см^3$ буферного раствора и круговыми движениями растворяют сухой остаток. К полученному экстракту добавляют 0,8 $см^3$ раствора дансилхлорида, приготовленного по п. 8.2.1., перемешивают и немедленно переносят

смесь в пробирку с притертой пробкой вместимостью 5 $см^3$. Плотно закрытую пробирку помещают в водяную баню с температурой 55°С не менее чем на 40 мин для прохождения процесса получения дансил-производных.

Затем пробирку извлекают из водяной бани и охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору добавляют 1 $см^3$ бензола, интенсивно встряхивают в течении 5 минут и оставляют до момента четкого разделения фаз. Из верхнего прозрачного бензольно-ацетонового слоя пипеткой вместимостью 2,0 $см^3$ отбирают прозрачный экстракт и переносят в пробирку вместимостью 5 $см^3$ с пришлифованной пробкой. После этого экстракцию бензолом повторяют еще раз и снова отбирают прозрачный бензольно-ацетоновый экстракт, объединяя его с первой порцией. Суммарный объем растворителей из экстракта отдувают в токе азота досуха строго в вытяжном шкафу. К полученному сухому остатку добавляют 1 $см^3$ подвижной фазы, плотно закрывают и растворяют сухой остаток путем интенсивного встряхивания. Полученный прозрачный раствор хроматографируют дважды при условиях хроматографирования, указанных в п. 8.3.1.

9.4 Приготовление пробы с добавкой

Приготовление и анализ пробы с добавкой проводят 1 раз в серии из 5 образцов. Для этого из средней пробы образца, приготовленной по п. 9.3.1 отбирают 2 навески по 100 г, взвешенные с точностью 0,1 г. Каждую навеску помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 $см^3$. К навеске добавляют 150 $см^3$ дистиллированной воды и при помощи пипетки вместимостью 1 $см^3$ вносят раствор ДПНА с концентрацией 2,00 мкг/$см^3$ (п. 8.2.7.1) в количестве 1 $см^3$ и основной раствор смеси ДМНА и ДЭНА (п. 8.2.9.1) в количестве 3,3 $см^3$ при помощи пипетки вместимостью 5 $см^3$.

Дальнейший анализ проводят по п. 9.3.1-9.3.2.

10 Результаты измерений

10.1 Расчет содержания НА

10.1.1 Расчет концентрации ДМНА в холостой пробе

Концентрация ДМНА в холостой пробе рассчитывается на основании измерений, проведенных в соответствии с п. 9.2.

$$C'_{ДМНАхол1} = \frac{C_{вн.ст.} \times S_{ДМНАхол1} \times \overline{\overline{K}}_{отнДМНА}}{S_{вн.ст.хол1}} \qquad (10)$$

где

$C_{ДМНАхол1}$ - концентрация ДМНА в холостой пробе по 1 хроматограмме, мкг/$см^3$;

$S_{ДМНАхол1}$ - площадь пика ДМНА в холостой пробе по 1 хроматограмме;

$\overline{\overline{K}}_{отнДМНА}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДМНА (рассчитывается по формуле (7));

$C_{вн.ст.}$ - концентрация внутреннего стандарта, мкг/$см^3$, ($C_{вн.ст.}$=2,00 мкг/$см^3$);

$S_{вн.ст.хол1}$ - площадь пика внутреннего стандарта (ДПНА) в холостой пробе по 1 хроматограмме;

Аналогично рассчитывают концентрацию ДМНА по 2 хроматограмме $C'_{ДМНАхол2}$, по формуле (10).

Затем рассчитывают среднюю концентрацию ДМНА холостой пробы $\overline{C}_{ДМНАхол}$ по формуле:

$$\overline{C}_{ДМНАхол} = \frac{C_{ДМНАхол1} + C_{ДМНАхол2}}{2} \quad (11)$$

где

$\overline{C}_{ДМНАхол}$ - среднее значение концентрации ДМНА в холостой пробе, мкг/см^3.

10.1.2 Расчет концентрации ДЭНА в холостой пробе

Концентрация ДЭНА в холостой пробе рассчитывается на основании измерений, проведенных в соответствии с п. 9.2.

$$C_{ДЭНАхол} = \frac{C_{вн.ст} \times S_{ДМНАхол1} \times \overline{\overline{K}}_{отнДЭНА}}{S_{вн.ст.хол1}} \quad (12)$$

где

$C_{ДЭНАхол1}$ - концентрация ДЭНА в холостой пробе по 1 хроматограмме, мкг/см^3;

$S_{ДЭНАхол1}$ - площадь пика ДЭНА в холостой пробе по 1 хроматограмме;

$\overline{\overline{K}}_{отнДЭНА}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДЭНА (найден по формуле (8))

$C_{вн.ст.}$ - концентрация внутреннего стандарта (2мкг/см^3), мкг/см^3;

$S_{вн.ст.хол1}$ - площадь пика внутреннего стандарта (ДПНА) в холостой пробе по 1 хроматограмме;

Аналогично рассчитывают концентрацию ДЭНА по 2 хроматограмме: $C_{ДМНАхол2}$, по формуле (12)

Затем рассчитывают среднюю концентрацию ДЭНА холостой пробы $\overline{C}_{ДМНАхол}$ по формуле:

$$\overline{C}_{ДМНАхол} = \frac{C_{ДЭНАхол1} + C_{ДЭНАхол2}}{2} \quad (13)$$

где

$\overline{C}_{ДЭНАхол}$ - среднее значение концентрации ДЭНА в холостой пробе, мкг/см^3.

10.1.3 Расчет концентрации ДМНА в пробе образца

$$C_{1\ ДМНАобр1} = \frac{C_{вн.ст.} \times S_{1\ ДМНАобр1} \times \overline{\overline{K}}_{отнДМНА}}{S_{1\ вн.ст\ обр1}} \quad (14)$$

где

$C_{1\ ДМНАобр1}$ - концентрация ДМНА в анализируемом образце первой параллели по 1 хроматограмме, мкг/см^3;

$S_{1\ ДМНАобр1}$ - площадь пика ДМНА в исследуемом образце первой параллели по 1 хроматограмме.

$\overline{\overline{K}}_{отн/ДМНА}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДМНА (найден по формуле 7)

$C_{вн.ст.}$ - концентрация внутреннего стандарта (2мкг/см^3), мкг/см^3;

$S_{I\ вн.ст.хол}$ - площадь пика внутреннего стандарта (ДПНА) в холостой пробе первой параллели по 1 хроматограмме;

Аналогично, по формуле (14), рассчитывают концентрацию ДМНА по 2 хроматограмме первой параллельной пробы образца: $C_{I\ ДМНАобр2}$.

Среднее значение концентрации ДМНА в первой параллельной пробе образца рассчитывают по следующей формуле

$$\overline{C}_{I\ ДМНАобр} = \frac{C_{I\ ДМНАобр1} + C_{I\ ДМНАобр2}}{2} \qquad (15)$$

где

$\overline{C}_{I\ ДМНАобр}$ - среднее значение концентрации ДМНА в первой параллельной пробе образца, мкг/см^3;

Содержание ДМНА в первом параллельном образце рассчитывают по формуле

$$X_{I\ ДМНАобр} = \frac{\left(\overline{C}_{I\ ДМНАобр} - \overline{C}_{ДМНАхол}\right) \times V}{P_I} \qquad (16)$$

где

$X_{I\ ДМНАобр}$ - содержание ДМНА в первом параллельном образце, мкг/г (мг/кг);

P_I - навеска образца первой параллельной пробы, г.

V – объем анализируемого экстракта, см^3.

Аналогично рассчитывают содержание ДМНА для второго параллельного образца $\left(X_{II\ ДМНАобр}\right)$

$$X_{II\ ДМНАобр} = \frac{\left(\overline{C}_{II\ ДМНАобр} - \overline{C}_{ДМНАхол}\right) \times V}{P_{II}} \qquad (17)$$

где

$X_{II\ ДМНАобр}$ - содержание ДМНА во втором параллельном образце, мкг/г (мг/кг);

$\overline{C}_{II\ ДМНАобр}$ - среднее значение концентрации ДМНА во второй параллельной пробе образца, мкг/см^3, рассчитывается аналогично первой параллельной пробе по формулам (14), (15);

P_{II} - навеска образца второй параллельной пробы, г.

Среднее значение содержания ДМНА в образце рассчитывают по следующей формуле:

$$\overline{X}_{ДМНА} = \frac{X_{I\ ДМНАобр} + X_{II\ ДМНАобр}}{2} \qquad (18)$$

где

$\overline{X}_{ДМНА}$ - среднее значение содержания ДМНА в исследуемом образце, мг/кг.

10.1.4 Расчет концентрации ДЭНА в пробе образца

$$C_{I\ ДЭНАобр1} = \frac{C_{вн.ст.} \times S_{I\ ДЭПАобр1} \times \overline{\overline{K}}_{отн/ГМА}}{S_{I\ вн.ст.обр1}} \qquad (19)$$

где

$C_{I\ ДЭНАобр1}$ - концентрация ДЭНА в анализируемой пробе образца первой параллели по 1 хроматограмме, мкг/см^3;

$S_{I\ ДЭНАобр1}$ - площадь пика ДЭНА в анализируемой пробе образца первой параллели по 1 хроматограмме.

$\overline{\overline{K}}_{отн/ГМА}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДЭНА (рассчитывается по формуле (8));

$C_{вн.ст}$ - концентрация внутреннего стандарта, мкг/см^3;

$S_{I\ вн.ст.хол}$ - площадь пика внутреннего стандарта (ДПНА) в холостой пробе первой параллели по 1 хроматограмме.

Аналогично, по формуле (19), рассчитывают концентрацию ДЭНА по 2 хроматограмме первой параллельной пробы образца: $C_{I\ ДЭНАобр2}$.

Среднее значение концентрации ДМНА в первой параллельной пробе образца, при выполнении условия повторяемости по п. 11.1, рассчитывают по следующей формуле

$$\overline{C}_{I\ ДЭНАобр} = \frac{C_{I\ ДЭНАобр1} + C_{I\ ДЭНАобр2}}{2} \qquad (20)$$

где

$\overline{C}_{I\ ДЭНАобр}$ - среднее значение концентрации ДЭНА в первой параллельной пробе образца, мкг/см^3;

Содержание ДЭНА в первом параллельном образце рассчитывают по формуле

$$X_{I\ ДЭНАобр} = \frac{\left(\overline{C}_{I\ ДЭНАобр} - \overline{C}_{ДЭПАхол}\right) \times V}{P_I} \qquad (21)$$

где

$X_{I\ ДЭНАобр}$ - содержание ДЭНА в первом параллельном образце, мкг/г (мг/кг);

P_I - навеска образца первой параллельной пробы, г

Аналогично, по формулам (20)-(21), рассчитывают концентрацию ДЭНА для второй параллельной пробы образца $\left(X_{II\ ДЭНАобр}\right)$:

$$X_{II\ ДЭНАобр} = \frac{\left(\overline{C}_{II\ ДЭПАобр} - \overline{C}_{ДЭПАхол}\right) \times V}{P_{II}} \qquad (22)$$

где

$X_{II\ ДЭНАобр}$ - содержание ДЭНА во втором параллельном образце, мкг/г (мг/кг);

P_{II} - навеска образца второй параллельной пробы, г

Среднее значение содержания ДЭНА в образце, при выполнении условия повторяемости по п. 11.1, рассчитывают по следующей формуле

$$\overline{X}_{ДЭНА} = \frac{X_{I\ ДЭНАобр} + X_{II\ ДЭНАобр}}{2} \quad (23)$$

где

$\overline{X}_{ДЭНА}$ - среднее значение содержания ДЭНА в исследуемом образце, мг/кг.

Средние значения содержания ДМНА и ДЭНА округляют до пятого знака после запятой.

10.1.5 Расчет содержания суммы ДМНА и ДЭНА в образце

Содержание суммы ДМНА и ДЭНА $\left(X_{ДМНА-ДЭНА}\right)$, мг/кг в анализируемом образце вычисляют по следующей формуле

$$X_{ДМНА\ ДЭНА} = \overline{X}_{ДМНА} + \overline{X}_{ДЭНА} \quad (24)$$

Значения содержания суммы ДМНА и ДЭНА округляют до четвертого знака после запятой.

Если массовая концентрация ДМНА или ДЭНА меньше предела измерения методики $C_{LOQДМНА}$ или $C_{LOQДЭНА}$ соответственно, то дают одностороннюю оценку массовой концентрации ДМНА или ДЭНА в пробе в виде $X_{ДМНА} < X_{LOQДМНА}$ или $X_{ДЭНА} < X_{LOQДЭНА}$ (значения $X_{LOQДМНА}$, $X_{LOQДЭНА}$ приведены в таблице 1). Если массовая концентрация только одного из определяемых НА меньше предела измерения методики, то результат выдается по другому НА.

11 Проверка приемлемости результатов испытаний

Проверку приемлемости результатов осуществляют согласно СТБ ИСО 5725-6-2002. Результаты испытаний должны быть получены в условиях повторяемости и промежуточной прецизионности.

11.1 Контроль по внутреннему стандарту

Отклонение площади пика внутреннего стандарта во всех испытуемых пробах не должно превышать 10% от значения, полученного при расчете относительного градуировочного коэффициента. Если отклонение площади пика внутреннего стандарта превышает указанную величину, необходимо выяснить и устранить его причины и повторить анализ.

11.1 Контроль повторяемости результатов измерений

Контроль проводится по двум результатам измерений, полученным в условиях повторяемости. Значение абсолютной разности между двумя результатами измерений для каждого определяемого НА должны сравниваться с абсолютным значением пределов повторяемости $r_{абсДМНА}$, $r_{абсДЭНА}$, рассчитываемым по формулам

$$r_{абсДМНА} = r_{пДМНА} \times 0{,}01 \times \overline{X}_{ДМНА} \quad (25)$$

где

$r_{пДМНА}$ - относительное значение предела повторяемости для ДМНА (таблица1), %;

0,01 - коэффициент пересчета процентов;

$\overline{X}_{ДМНА}$ - массовая концентрация ДМНА в двух параллельных пробах, мг/кг.

$$r_{абс ДЭНА} = r_{п ДЭНА} \times 0{,}01 \times \overline{X}_{ДЭНА} \quad (26)$$

где

$r_{пДЭНА}$ - относительное значение предела повторяемости для ДЭНА (таблица1), %;

0,01 - коэффициент пересчета процентов;

$\overline{X}_{ДЭНА}$ - массовая концентрация ДЭНА в двух параллельных пробах, мг/кг.

Если для значения абсолютного расхождения между двумя результатами измерений в параллельных пробах выполняются условия

$$X_{I\ ДМНАобр} - X_{II\ ДМНАобр} \le r_{абсДМНА} \quad (27)$$

$$\left| X_{I\ ДЭНАобр} - X_{II\ ДЭНАобр} \right| \le r_{абсДЭНА}, \quad (28)$$

то два результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений массовой концентрации соответствующего НА указывают среднее значение $\overline{X}_{ДМНА}$ и $\overline{X}_{ДЭНА}$, рассчитанное по формулам (18), (23).

Если значение абсолютного расхождения между двумя результатами параллельных измерений массовой концентрации ДМНА или ДЭНА превышает значение $r_{абс}$, то следует получить еще два результата. Если размах четырех результатов испытаний для ДМНА и ДЭНА меньше либо равен критическому размаху (формулы (29) – (30)), то среднее арифметическое четырех результатов (формулы (33), (34)) должно указываться как окончательный результат измерений $\overline{X}_{окДМНА}$ и $\overline{X}_{окДЭНА}$.

$$\left| X_{\max ДМНА} - X_{\min ДМНА} \right| \le CR_{0,95 ДМНА} \quad (29)$$

$$\left| X_{\max ДЭНА} - X_{\min ДЭНА} \right| \le CR_{0,95 ДЭНА} \quad (30)$$

$$CR_{0,95 ДМНА} = 0{,}01 \cdot \overline{X}_{окДМНА} \cdot 3{,}6 \cdot \sigma_{пДМНА} \quad (31)$$

$$CR_{0,95 ДЭНА} = 0{,}01 \cdot \overline{X}_{окДЭНА} \cdot 3{,}6 \cdot \sigma_{пДЭНА} \quad (32)$$

где

$\sigma_{пДМНА}$ - показатель повторяемости для ДМНА (таблица 1), %;

$\sigma_{пДЭНА}$ - показатель повторяемости для ДЭНА (таблица 1), %;

3,6 - коэффициент критического размаха для $n = 4$,при P =95 %;

$\overline{X}_{окДМНА}, \overline{X}_{окДЭНА}$ - средние арифметические четырех результатов измерений, рассчитываемые по формулам

$$\overline{X}_{окДМНА} = \frac{\sum_{i=1}^{4} X_{iДМНА}}{4} \quad (33)$$

$$\overline{X}_{окДЭНА} = \frac{\sum_{i=1}^{4} X_{iДЭНА}}{4} \quad (34)$$

Если при получении четырех результатов измерений условия (29), (30) не выполняются, то следует выяснить и устранить причину неудовлетворительных результатов и повторить измерения.

11.2 Контроль приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности, осуществляют согласно СТБ ИСО 5725-6-2002.

После проверки полученных результатов параллельных определений по критерию повторяемости п. 11.1 рассчитывают $\overline{\overline{X}}_{ДМНА}$ и $\overline{\overline{X}}_{ДЭНА}$

$$\overline{\overline{X}}_{ДМНА} = \frac{\overline{X}_{I\ ДМНА} + \overline{X}_{II\ ДМНА}}{2} \quad (35)$$

где

$\overline{X}_{I\ ДМНА}$ - среднее значение массовой концентрации ДМНА рассчитанное по формуле (18) на основании двух параллельных измерений первым оператором, мг/кг;

$\overline{X}_{II\ ДМНА}$ - среднее значение массовой концентрации ДМНА рассчитанное по формуле (18) на основании двух параллельных измерений вторым оператором, мг/кг;

$\overline{\overline{X}}_{ДМНА}$ - среднее значение массовой концентрации ДМНА, рассчитанное на основании результатов измерений двух операторов, мг/кг.

$$\overline{\overline{X}}_{ДЭНА} = \frac{\overline{X}_{I\ ДЭНА} + \overline{X}_{II\ ДЭНА}}{2} \quad (36)$$

где

$\overline{X}_{I\ ДЭНА}$ - среднее значение массовой концентрации ДЭНА рассчитанное по формуле (23) на основании двух параллельных измерений первым оператором, мг/кг;

$\overline{X}_{II\ ДЭНА}$ - среднее значение массовой концентрации ДЭНА рассчитанное по формуле (23) на основании двух параллельных измерений вторым оператором, мг/кг;

$\overline{\overline{X}}_{ДЭНА}$ - среднее значение массовой концентрации ДЭНА, рассчитанное на основании результатов измерений двух операторов, мг/кг.

Рассчитывают абсолютные разности результатов $\overline{X}_{I\ ДМНА}$, $\overline{X}_{II\ ДМНА}$ и $\overline{X}_{I\ ДЭНА}$, $\overline{X}_{II\ ДЭНА}$ и сравнивают их со значением критической разности $CR_{абс}$

$$CR_{абсДМНА} = CR_{0,95\,ДМНА} \cdot 0{,}01 \cdot \overline{\overline{X}}_{ДМНА} \quad (37)$$

$$CR_{абсДЭНА} = CR_{0,95\,ДЭНА} \cdot 0{,}01 \cdot \overline{\overline{X}}_{ДЭНА} \quad (38)$$

$$CR_{0,95\,ДМНА} = \sqrt{r^2_{I(ITO)ДМНА} - \frac{r^2_{ДМНА}}{2}} \quad (39)$$

где

$r_{I(ITO)ДМНА}$ - относительный предел промежуточной прецизионности для ДМНА, указанный в таблице 1, %;

$r_{ДМНА}$ - относительный предел повторяемости для ДМНА, указанный в таблице 1, %;

$$CR_{0,95\,ДЭНА} = \sqrt{r^2_{I(ITO)ДЭНА} - \frac{r^2_{ДЭНА}}{2}} \quad (40)$$

где

$r_{I(ITO)ДЭНА}$ - относительный предел промежуточной прецизионности для ДЭНА, указанный в таблице 1, %;

$r_{ДЭНА}$ - относительный предел повторяемости для ДЭНА, указанный в таблице 1, %.

Если для значения абсолютных расхождений между результатами выполняются условия

$$\left|X_{I\ ДМН.1} - X_{II\ ДМНА}\right| \le CR_{абс ДМН.1} \quad (41)$$

$$\left|X_{I\ ДЭН.1} - X_{II\ ДЭН.1}\right| \le CR_{абс ДЭН.1}, \quad (42)$$

то конечные результаты, полученные в условиях промежуточной прецизионности, считаются приемлемыми и средние значения $\overline{\overline{X}}_{ДМНА}$ и $\overline{\overline{X}}_{ДЭН.1}$, рассчитанные по формулам (35), (36), могут быть использованы в качестве заявляемого результата.

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

11.3 Контроль степени извлечения

Для контроля степени извлечения используют результаты анализа проб с добавкой, полученные по п. 9.4, и тех же проб без добавки в соответствии с п. 9.3. Расчет степени извлечения $(\mathrm{Re}c)$ производят по следующим формулам:

$$\overline{X}_{обДМН.1} = \frac{X_{I\ обДМН.1} + X_{II\ обДМН.1}}{2} \quad (43)$$

где

$\overline{X}_{обДМНА}$ - среднее содержание ДМНА в пробе с добавкой, мг/кг;

$X_{I\ обДМНА}$ - содержание ДМНА в первой параллельной пробе с добавкой, мг/кг;

$X_{II\ обДМН.1}$ - содержание ДМНА во второй параллельной пробе с добавкой, мг/кг.

$$\overline{X}_{контрДМНА} = \frac{X_{I\ контрДМН.1} + X_{II\ контрДМН.1}}{2} \quad (44)$$

где

$\overline{X}_{контрДМН.1}$ - среднее содержание ДМНА в пробе без добавки, мг/кг;

$X_{I\ контрДМН.1}$ - содержание ДМНА в первой параллельной пробе без добавки, мг/кг;

$X_{II\ контрДМНА}$ - содержание ДМНА во второй параллельной пробе без добавки, мг/кг.

$$X_{доб.изм ДМНА} = \overline{X}_{обрДМНА} - \overline{X}_{контрДМН.1} \quad (45)$$

где

$X_{доб.изм ДМН.1}$ - величина добавки ДМНА, полученная экспериментально, мг/кг.

$$\mathrm{Re}c_{ДМН.1} = \frac{X_{доб.изм ДМНА}}{X_{доб\ теор ДМНА}} \times 100 \quad (46)$$

где

$\mathrm{Re}c_{ДМНА}$ - степень извлечения ДМНА из образца, %.

$X_{доб\ теорДМН.1}$ - рассчитанная по процедуре приготовления величина добавки ДМНА, мг/кг, ($X_{доб\ теорДМНА}$=0,01000 мг/кг).

$$\overline{X}_{обДЭНА} = \frac{X_{I\ обДЭНА} + X_{II\ обДЭНА}}{2} \quad (47)$$

где

$\overline{X}_{обДЭНА}$ - среднее содержание ДЭНА в пробе с добавкой, мг/кг;

$X_{I\ обДЭН.1}$ - содержание ДЭНА в первой параллельной пробе с добавкой, мг/кг;

$X_{II\ обДЭПА}$ - содержание ДЭНА во второй параллельной пробе с добавкой, мг/кг.

$$\overline{X}_{контрДЭН1} = \frac{X_{I\ контрДЭПА} + X_{II\ контрДЭПА}}{2} \quad (48)$$

где

$\overline{X}_{контрДЭПА}$ - среднее содержание ДЭНА в пробе без добавки, мг/кг;

$X_{I\ контрДЭПА}$ - содержание ДЭНА в первой параллельной пробе без добавки, мг/кг;

$X_{II\ контрДЭН1}$ - содержание ДЭНА во второй параллельной пробе без добавки, мг/кг.

$$X_{доб.изм.ДЭН.1} = \overline{X}_{обрДЭПА} - \overline{X}_{контрДЭПА} \quad (49)$$

где

$X_{доб.изм.ДЭПА}$ - величина добавки ДЭНА, полученная экспериментально.

$$\mathrm{Re}c_{ДЭН.1} = \frac{X_{доб.изм.ДЭН1}}{X_{доб.теор.ДЭН.1}} \times 100 \quad (50)$$

где

$\mathrm{Re}c_{ДЭН.1}$ - степень извлечения ДЭНА из образца, %.

$X_{доб.теор.ДЭН.1}$ - рассчитанная по процедуре приготовления величина добавки ДЭНА, мг/кг, ($X_{доб\ теор.ДЭН1}$=0,01505 мг/кг).

Если степень извлечения ДМНА и ДЭНА находится в интервале от 90 % до 110 %, то результаты измерений считаются удовлетворительными, в противном случае необходимо принять меры по устранению причин данного несоответствия.

12 Проверка стабильности результатов испытаний

Проверку стабильности результатов измерений производят с использованием карты Шухарта (R-карта размахов) в соответствии с СТБ ИСО 5725-6-2002 п.6.2.

Используются данные, полученные при анализе рабочих проб. Контрольные карты строятся по отдельности для ДМНА и ДЭНА.

При построении контрольной карты 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), %.

По полученным результатам измерений для ДМНА и ДЭНА на контрольных картах откладывают величину относительного размаха, w, %

$$w = 100 \cdot \frac{|x_1 - x_2|}{(x_1 + x_2)\ 2}, \quad (51)$$

где

x_1 и x_2 - результаты параллельных измерений содержания НА, мг/кг, рассчитанные для ДМНА и ДЭНА по формулам (16), (17) и (21), (22) соответственно;

100 - коэффициент пересчета в проценты.

Полученные значения заносят в лист данных контрольной карты, по форме приведенной в таблице 4.

Таблица 4 – Лист данных контрольной карты

Дата проведения анализа	Результаты параллельных измерений x_1, x_2, мг/кг				Относительный размах w, %		Относительное стандартное отклонение повторяемости s_r, %	
	ДМНА		ДЭНА		ДМНА	ДЭНА	ДМНА	ДЭНА

Оценку относительного стандартного отклонения повторяемости s_r, рассчитанную по данным контрольной карты, получают по формуле

$$s_r = \sum_{i=1}^{L} w_i \Big/ \left(L \cdot d_2\right) = \overline{w}/d_2 , \qquad (52)$$

где

L – количество проведенных измерений.

Полученная оценка относительного стандартного отклонения повторяемости s_r используется вместо установленного показателя повторяемости при построении следующей контрольной карты размаха.

Далее поступают в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6-2002 п.6.2.2.

13 Оформление результатов измерений

Результаты измерений оформляют по форме, которая должна включать следующую информацию:

– наименование (шифр) пробы;

– дату проведения измерений;

– результаты измерений;

– фамилию оператора.

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

$$(X_{ДМНА-ДЭНА} \pm U(X_{ДМНА-ДЭНА})),\ \text{мг/кг} \qquad (53)$$

где $X_{ДМНА-ДЭНА}$ - содержание суммы НА, полученное в соответствии с настоящей методикой и рассчитанное согласно формуле (24), по результатам 2-х параллельных исследований одного образца;

$U(X_{ДМНА-ДЭНА})$ – абсолютное значение оценки расширенной неопределенности результата измерений суммы ДМНА и ДЭНА, мг/кг.

Оценка расширенной неопределенности результата измерений суммы ДМНА и ДЭНА производится по методикам оценки неопределенности, утвержденным в установленном порядке.

Методика разработана лабораторией хроматографических исследования, отдела физико-химических исследований ГУ «РНПЦ гигиены» МЗ РБ.

Разработчики:

Зав.отделом ФХИ,
канд. химических наук — Н.И. Марусич

Ст. научный сотрудник — Н.П. Левошук

Мл. научный сотрудник — И.Н. Масалов

Литература

[1] Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, утвержденными Постановлением Министерства Здравоохранения от 09 июня 2009 г. № 63.

[2] Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В., Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. –М.,: Химия, 1986. – 288 с.

[3] СТБ ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч.6. Использование значений точности на практике. – Минск: Госстандарт, 2003 – 42 с.

[4] Гиошон Ж., Гийемен К., Количественная газовая хроматография для лабораторных анализов и промышленного контроля ч.2. – М.,: Мир, 1994. – 375 с.

Приложение А
(Обязательное)

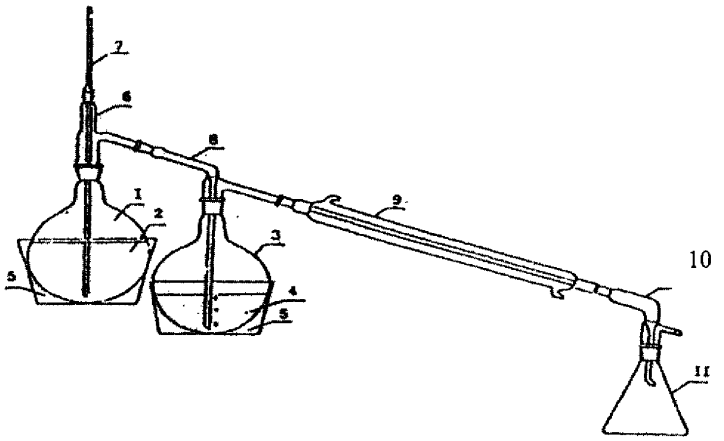


Рисунок А.1. Схема установки для перегонки с водяным паром для выделения летучих НА из пробы.

1. Паровик;
2. Дистиллированная вода;
3. Круглодонная колба;
4. Гомогенизат исследуемого продукта;
5. Баня с глицерином;
6. Насадка Вюрца;
7. Трубка на шлифе;
8. Насадка-барбатер;
9. Холодильник Либиха;
10. Аллонж;
11. Приемник.

gost.e-ecolog.ru