

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Министра Бел ГИМ

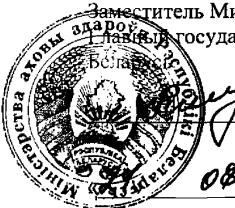


УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Главный государственный врач Республики

В.И. Качан



2010г.

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

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ**

СОГЛАСОВАНО

Зам. директора Бел ГИМ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный врач Республики
Беларусь

_____ Т.А. Коломисец

_____ В.И. Качан

«___» _____ 2010г.

«___» _____ 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 высокоеффективной 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 $^{\circ}\text{C}$, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. Структурная формула - $(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{N}=0$, молекулярная масса – 74,08.

Диэтилнитрозамин – маслянистая жидкость, d^{20} 0,95, температура кипения – 176,9 $^{\circ}\text{C}$, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. Структурная формула - $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}-\text{N}=0$, 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 копченостях – 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, денитрозированием НА бромистым водородом в уксусной кислоте до соответствующих аминов, получении производных аминов с 5-(диметиламино)-нафталин-1-сульфохлоридом (далее - дансилихлоридом), 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 дансилипроизводных НА производится по временам удерживания, а количественное определение содержания ДМНА и ДЭНА – методом внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта применяется дипропиленитрозамин (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) $r_{(T)}$, %
			повторяемости S_r , %	промежуточной прецизионности $S_{(T)}$, %		
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 смешения) 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, Agilent 1100 включающий:

- насос с вакуумным дегазатором
- термостат колонок
- флюориметрический детектор
- систему управления и обработки данных

Весы лабораторные электронные с точностью взвешивания 0,0001г, Adventurer AR2140

Микрошиприц для хроматографа, «Hamilton» 50мкл, цена деления 1 мкл

Пипетка 2 кл. точности 0,1 см³, цена деления 0,002 см³

Пипетки 1-1-1-1

1-1-1-2

1-1-1-5

1-1-1-10

Колба мерная 2-(50,100,200,250,500,1000)-2

Цилиндр мерный 3-(50,1000)-1

Пробирка со шлифом П-2-(5,10) 14/23 ХС

Фирма Ohaus

фирма «Sigma-Aldrich», производитель USA

ГОСТ 20292-74

ГОСТ 29227-91

ГОСТ 1770-74

ГОСТ 1770-74

ГОСТ 1770-74

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Кондиционер Н 07 ZP

Фирма Samsung

Водяная баня HB4 digital

Фирма IKA

Баня песчаная

ТУ 25-11-917-74

Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М

ТУ 64-1-423-72

Баня водяная

ГОСТ 25336-82

Воронки ВД-1-500

Воронки конические, стеклянные диаметром 30-33 мм	ГОСТ 25336-82
Колба К,-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», каталогный № N 7756
Дизтилнитрозамин, ρ=0,95 г/см ³	фирма «Sigma», каталогный № N 0756
Дипропилнитрозамин, 100мг	фирма «Supelko», каталогный № 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» каталогный № 18735
Хлористый метилен, для ВЭЖХ	фирма «Merck»
Натрий сернокислый безводный, ≥99,0%	фирма «Sigma-Aldrich»
Дансилхлорид, 95%	фирма «Sigma», каталогный № 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)⁰С;
- температура воздуха при измерении (20 ± 5)⁰С;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа;
- влажность воздуха (65 ± 15)% при температуре 25⁰С;
- напряжение питающей сети (230 ± 10) В;
- частота переменного тока ($50\pm0,4$) Гц.

Выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводится 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 водянную баню при температуре 40-50 °C, 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 °C до 8 °C.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Раствор дансиликлорида с концентрацией 0,5 мг см³.

Навеску дансиликлорида массой 26,5 мг помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³ и растворяют в 20 см³ ацетона, доводят до метки ацетоном. Готовый раствор хранят в холодильнике при температуре от 2 °C до 8 °C, тщательно предохраняя от попадания влаги. Срок хранения – не более 3 месяцев.

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

В коническую колбу вместительностью 50 см³ вносят 5 см³ 33%-ного бромистого водорода в уксусной кислоте и добавляют 45 см³ ледяной уксусной кислоты. Смесь хранят в холодильнике при температуре от 2 °C до 8 °C 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 см³ помещают 3,2 г NaOH и вливают 200 см³ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения щелочи, добавляют 20,0 г NaHCO₃. 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 см³ помещают 200 см³ дистиллированной воды.Добавляют 6,7 см³ концентрированной серной кислоты (плотностью 1,98 г/см³), 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 см³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 20 см³ метилового спирта.Добавляют 1 см³ ДМНА (кат. № 7756) 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 °C до 8 °C 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 °C до 8 °C 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 °C до 8 °C 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 °C до 8 °C 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 °C до 8 °C 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 °C до 8 °C не более 6 месяцев.

8.2.8 Подвижная фаза для жидкостного хроматографа – смесь ацетонитрила : 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 водянью баню при температуре 40-50 °C, 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 °C до 8 °C 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 2⁰С до 4⁰С 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, см ³	Объем рабочего раствора ДПНА, см ³
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 метиленса, 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 дапсилпроизводных НА.

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

денитранизации не менее чем на 30 минут при комнатной температуре. Упаривают хлористый метилен на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 30°C приблизительно до 2 см³. Полученный экстракт количественно переносят в фарфоровую чашку, колбу для упаривания омывают 0,5 см³ уксусной кислоты и присоединяют к содержимому фарфоровой чашки. Экстракт осторожно упаривают на песчаной бане при температуре не более 120°C досуха.

Чашку с сухим остатком охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения в фарфоровую чашку пипеткой вместимостью 1 см³ добавляют 0,6 см³ буферного раствора (п. 8.2.3.) и круговыми движениями растворяют сухой остаток. К полученному экстракту при помощи пипетки вместимостью 1 см³ добавляют 0,8 см³ раствора дансилахлорида, приготовленного по п. 8.2.1., перемешивают и немедленно переносят смесь в пробирку с притертой пробкой вместимостью 5 см³. Плотно закрытую пробирку помещают в водянную баню с температурой 55°C не менее чем на 40 мин для прохождения процесса получения дансила-производных.

Затем пробирку извлекают из водянной бани и охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору добавляют 1 см³ бензола, интенсивно встряхивают в течении 5 мин и оставляют до момента четкого разделения фаз. Из верхнего прозрачного бензольно-ацетонового слоя пипеткой вместимостью 2,0 см³ отбирают прозрачный экстракт и переносят в сухую пробирку вместимостью 5 см³ 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 см³ 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 дансила-производных, в полученных градуировочных растворах.

Полученные растворы дансила-производных ДМНА, ДЭНА и ДПНА хранятся в холодильнике в течении 20 дней при температуре 4-5 °C. 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 см³, соединенную с паровиком и прямым холодильником в соответствии с рисунком, приведенным в приложении А, помещают 250 см³

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 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. 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 x 4,6 мм), заполненная сорбентом Eclipse XDB-C18, размер частиц 5 мкм;
- температура колонки 30 °С;
- подвижная фаза – смесь ацетонитрил-вода в объемном соотношении 7:3,
- скорость элюирования – 1,2 см³/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 дансилипроизводных НА устанавливают по градуировочным растворам при вышеуказанных 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 аликовотную часть 0,020 см³ 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 $\bar{K}_{\text{отн}}$ для каждой концентрации ДМНА и ДЭНА относительно внутреннего стандарта с концентрацией 2,00 мкг/см³ по формулам (1) – (6), средние значения коэффициентов $\bar{\bar{K}}_{\text{отн}}$ рассчитывают по формулам (7), (8) для каждого определяемого НА (ДМНА и ДЭНА) во всем диапазоне измерений.

$$\bar{S}_{\text{ДМН.хол}} = \frac{\sum_{j=1}^3 S_{\mu\text{МН.хол}}}{3}, \quad (1)$$

где

$\bar{S}_{\text{ДМН.хол}}$ – средняя площадь пика ДМНА в холостой пробе;

$S_{j\text{ДМН.хол}}$ – площадь пика ДМНА при j-ом измерении холостой пробы.

$$\bar{S}_{\text{ДЭН.хол}} = \frac{\sum_{j=1}^3 S_{\mu\text{ЭН.хол}}}{3} \quad (2)$$

$\bar{S}_{\text{ДЭН.хол}}$ – средняя площадь пика ДЭНА в холостой пробе;

$S_{j\text{ДЭН.хол}}$ – площадь пика ДЭНА при j-ом измерении холостой пробы.

$$K_{ijomn_{ДМНА}} = \frac{C_{iДМНА} \cdot S_{ijon_cm}}{C_{an_cm} \cdot (S_{jДМНА} - \bar{S}_{ДМНА_{станд}})} \quad (3)$$

где

$K_{ijomn_{ДМНА}}$ - 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/см³;

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

C_{an_cm} - концентрация внутреннего стандарта (ДПНА) в i-ом градуировочном растворе, мкг/см³, ($C_{an_cm} = 2,00$ мкг/см³);

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

$$\bar{K}_{ijomn_{ДМНА}} = \frac{\sum_{i=1}^9 K_{ijomn_{ДМНА}}}{9} \quad (4)$$

где

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

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

$$K_{ijomn_{ДЭНА}} = \frac{C_{iДЭНА} \cdot S_{ijon_cm}}{C_{an_cm} \cdot (S_{jДЭНА} - \bar{S}_{ДЭНА_{станд}})} \quad (5)$$

где

$K_{ijomn_{ДЭНА}}$ - 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/см³;

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

C_{an_cm} - концентрация внутреннего стандарта (ДПНА) в i-ом градуировочном растворе, мкг/см³, ($C_{an_cm} = 2,00$ мкг/см³);

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

$$\bar{K}_{ijomn_{ДЭНА}} = \frac{\sum_{i=1}^9 K_{ijomn_{ДЭНА}}}{9} \quad (6)$$

где

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

$$\overline{\overline{K}}_{отнДМН} = \frac{\sum_{i=1}^s \overline{K}_{iотнДМН}}{s} \quad (7)$$

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

$$\overline{\overline{K}}_{отнДЭН} = \frac{\sum_{i=1}^s K_{iотнДЭН}}{s} \quad (8)$$

$\overline{\overline{K}}_{отнДЭН}$ - 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 коэффициента
- 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 $K_{пробтДМН}$ и $K_{пробтДЭН}$ 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.

$$\frac{|\overline{K}_{отн} - \overline{K}_{пробт}|}{\overline{K}_{отн}} \cdot 100 \leq 10\%, \quad (9)$$

где

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

$K_{пробт}$ - 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 реагентов (контроль холостой пробы) проводят при использовании новой партии реагентов 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 реагентов, либо заменить реагенты. 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 см³. К навеске добавляют 150 см³ дистиллированной воды и при помощи пипетки вместимостью 1 см³ вносят раствор ДПНА концентрацией 2 мкг/см³ (п. 8.2.7.1) в количестве 1 см³. В полученную смесь добавляют 10 г хлорида натрия, 10 г сульфата натрия, 1 г сульфаниловой кислоты, 10 см³ 1 н раствора серной кислоты. Смесь перемешивают, колбу устанавливают в систему для отгонки НА с водяным паром, собирают 200-250 см³ дистиллята. Схема прибора для перегонки с водяным паром приведена в приложении А.

9.3.2 Экстракция НА из дистиллята

200-250 см³ дистиллята, полученного по п.9.3.1 помещают в делительную воронку на 500 см³, колбу ополаскивают 20 см³ хлористого метиленса, 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. Далее в осущененный 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 мин при комнатной температуре. Упаривают хлористый метилен на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 30°C. Полученный экстракт количественно переносят в фарфоровую чашку, колбу для упаривания омывают 0,5 см³ уксусной кислоты и присоединяют к содержимому фарфоровой чашки. Экстракт осторожно упаривают на песчаной бане при температуре не более 120°C досуха.

Чашку с сухим остатком охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения в фарфоровую чашку добавляют 0,6 см³ буферного раствора и круговыми движениями растворяют сухой остаток. К полученному экстракту добавляют 0,8 см³ раствора дансилхлорида, приготовленного по п. 8.2.1., перемешивают и немедленно переносят

смесь в пробирку с притертой пробкой вместимостью 5 см³. Плотно закрытую пробирку помещают в водяную баню с температурой 55°C не менее чем на 40 мин для прохождения процесса получения дансила-производных.

Затем пробирку извлекают из водяной бани и охлаждают до комнатной температуры. К полученному раствору добавляют 1 см³ бензола, интенсивно встряхивают в течении 5 минут и оставляют до момента четкого разделения фаз. Из верхнего прозрачного бензольно-ацетонового слоя пипеткой вместимостью 2,0 см³ отбирают прозрачный экстракт и переносят в пробирку вместимостью 5 см³ 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 см³ 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 см³. К навеске добавляют 150 см³ дистиллированной воды и при помощи пипетки вместимостью 1 см³ вносят раствор ДПНА с концентрацией 2,00 мкг/см³ (п. 8.2.7.1) в количестве 1 см³ и основной раствор смеси ДМНА и ДЭНА (п. 8.2.9.1) в количестве 3,3 см³ при помощи пипетки вместимостью 5 см³.

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.

$$C_{\text{ДМН.хол}} = \frac{C_{\text{вн.ст.}} \times S_{\text{ДМН.хол}} \times \bar{K}_{\text{отн.ДМН}}}{S_{\text{вн.ст.хол}}} \quad (10)$$

где

$C_{\text{ДМН.хол}}$ - концентрация ДМНА в холостой пробе по 1 хроматограмме, мкг/см³;

$S_{\text{ДМН.хол}}$ - площадь пика ДМНА в холостой пробе по 1 хроматограмме;

$\bar{K}_{\text{отн.ДМН}}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДМНА (рассчитывается по формуле (7));

$C_{\text{вн.ст.}}$ - концентрация внутреннего стандарта, мкг/см³, ($C_{\text{вн.ст.}} = 2,00 \text{ мкг/см}^3$);

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

Аналогично рассчитывают концентрацию ДМНА по 2 хроматограмме $C_{\text{ДМН.хол2}}$, по формуле (10).

Затем рассчитывают среднюю концентрацию ДМНА холостой пробы $\bar{C}_{\text{ДМН.хол}}$ по формуле:

$$\bar{C}_{\text{ДМН.хол}} = \frac{C_{\text{ДМН.хол1}} + C_{\text{ДМН.хол2}}}{2} \quad (11)$$

где

$C_{\text{ДМН.хол}}$ - среднее значение концентрации ДМНА в холостой пробе, мкг/см³.

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.

$$C_{\text{ДЭН.хол}} = \frac{C_{\text{вн.ст.}} \times S_{\text{ДЭН.хол1}} \times \bar{K}_{\text{отнДЭН1}}}{S_{\text{вн.ст.хол}}} \quad (12)$$

где

$C_{\text{ДЭН.хол1}}$ - концентрация ДЭНА в холостой пробе по 1 хроматограмме, мкг/см³;

$S_{\text{ДЭН.хол1}}$ - площадь пика ДЭНА в холостой пробе по 1 хроматограмме;

$\bar{K}_{\text{отнДЭН1}}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДЭНА (найден по формуле (8))

$C_{\text{вн.ст.}}$ - концентрация внутреннего стандарта (2мкг/см³), мкг/см³;

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

Аналогично рассчитывают концентрацию ДЭНА по 2 хроматограмме: $C_{\text{ДЭН.хол2}}$, по формуле (12)

Затем рассчитывают среднюю концентрацию ДЭНА холостой пробы $\bar{C}_{\text{ДЭН.хол}}$ по формуле:

$$\bar{C}_{\text{ДЭН.хол}} = \frac{C_{\text{ДЭН.хол1}} + C_{\text{ДЭН.хол2}}}{2} \quad (13)$$

где

$\bar{C}_{\text{ДЭН.хол}}$ - среднее значение концентрации ДЭНА в холостой пробе, мкг/см³.

10.1.3 Расчет концентрации ДМНА в пробе образца

$$C_{1\text{-ДМН.образ}} = \frac{C_{\text{вн.ст.}} \times S_{1\text{-ДМН.образ}} \times \bar{K}_{\text{отнДМН1}}}{S_{1\text{-вн.ст.образ}}} \quad (14)$$

где

$C_{1\text{-ДМН.образ}}$ - концентрация ДМНА в анализируемом образце первой параллели по 1 хроматограмме, мкг/см³;

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

$\bar{K}_{отн. DMHA}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДМНА (найден по формуле 7)

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

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

Аналогично, по формуле (14), рассчитывают концентрацию ДМНА по 2 хроматограмме первой параллельной пробы образца: $C_{I \text{ ДМН.раб2}}$.

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

$$\bar{C}_{I \text{ ДМН.раб}} = \frac{C_{I \text{ ДМН.раб1}} + C_{I \text{ ДМН.раб2}}}{2} \quad (15)$$

где

$\bar{C}_{I \text{ ДМН.раб}}$ - среднее значение концентрации ДМНА в первой параллельной пробе образца, $\text{мкг}/\text{см}^3$;

Содержание ДМНА в первом параллельном образце рассчитывают по формуле

$$X_{I \text{ ДМН.раб}} = \frac{(\bar{C}_{I \text{ ДМН.раб}} - \bar{C}_{I \text{ ДМН.хол}}) \times V}{P_I} \quad (16)$$

где

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

P_I - навеска образца первой параллельной пробы, г.

V - объем анализируемого экстракта, см^3 .

Аналогично рассчитывают содержание ДМНА для второго параллельного образца ($X_{II \text{ ДМН.раб}}$)

$$X_{II \text{ ДМН.раб}} = \frac{(\bar{C}_{II \text{ ДМН.раб}} - \bar{C}_{II \text{ ДМН.хол}}) \times V}{P_{II}} \quad (17)$$

где

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

$\bar{C}_{II \text{ ДМН.раб}}$ - среднее значение концентрации ДМНА во второй параллельной пробе образца, $\text{мкг}/\text{см}^3$, 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:

$$\bar{X}_{DMH} = \frac{X_{I \text{ ДМН.раб}} + X_{II \text{ ДМН.раб}}}{2} \quad (18)$$

где

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

10.1.4 Расчет концентрации ДЭНА в пробе образца

$$C_{I, \text{ДЭН.образ}} = \frac{C_{\text{вн.станд.}} \times S_{I, \text{ДЭПЛ.обр1}} \times \bar{K}_{\text{отн.ГИ.1}}}{S_{I, \text{вн.станд.обр1}}} \quad (19)$$

где

$C_{I, \text{ДЭН.образ}}$ - концентрация ДЭНА в анализируемой пробе образца первой параллели по 1 хроматограмме, мкг/см³;

$S_{I, \text{ДЭПЛ.обр1}}$ - площадь пика ДЭНА в анализируемой пробе образца первой параллели по 1 хроматограмме.

$\bar{K}_{\text{отн.ГИ.1}}$ - относительный градуировочный коэффициент для ДЭНА (рассчитывается по формуле (8));

$C_{\text{вн.станд.}}$ - концентрация внутреннего стандарта, мкг/см³;

$S_{I, \text{вн.станд.обр1}}$ - 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: $C_{I, \text{ДЭН.образ2}}$.

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

$$\bar{C}_{I, \text{ДЭПЛ.обр}} = \frac{C_{I, \text{ДЭПЛ.обр1}} + C_{I, \text{ДЭПЛ.обр2}}}{2} \quad (20)$$

где

$\bar{C}_{I, \text{ДЭПЛ.обр}}$ - среднее значение концентрации ДЭНА в первой параллельной пробе образца, мкг/см³;

Содержание ДЭНА в первом параллельном образце рассчитывают по формуле

$$X_{I, \text{ДЭПЛ.обр}} = \frac{(\bar{C}_{I, \text{ДЭПЛ.обр}} - \bar{C}_{\text{ДЭПЛ.хол}}) \times V}{P_I} \quad (21)$$

где

$X_{I, \text{ДЭПЛ.обр}}$ - 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 ($X_{II, \text{ДЭПЛ.обр}}$):

$$X_{II, \text{ДЭПЛ.обр}} = \frac{(\bar{C}_{II, \text{ДЭПЛ.обр}} - \bar{C}_{\text{ДЭПЛ.хол}}) \times V}{P_{II}} \quad (22)$$

где

$X_{II, \text{ДЭПЛ.обр}}$ - 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

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

где

$\bar{X}_{\text{ДЭНА}}$ - 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 ($X_{\text{ДМНА+ДЭНА}}$), мг/кг в анализируемом образце вычисляют по следующей формуле

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

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

Если массовая концентрация ДМНА или ДЭНА меньше предела измерения методики $C_{\text{лоудн}}$ или $C_{\text{лоудэн}}$ соответственно, то дают одностороннюю оценку массовой концентрации ДМНА или ДЭНА в пробе в виде $X_{\text{ДМНА}} < X_{\text{лоудн}}$ или $X_{\text{ДЭНА}} < X_{\text{лоудэн}}$ (значения $X_{\text{лоудн}}, X_{\text{лоудэн}}$ 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 градиуровочного 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 $r_{\text{абс,ДМНА}}$, $r_{\text{абс,ДЭНА}}$, рассчитываемым по формулам

$$r_{\text{абс,ДМНА}} = r_{\text{ДМНА}} \times 0,01 \times \bar{X}_{\text{ДМНА}} \quad (25)$$

где

$r_{\text{ДМНА}}$ - относительное значение предела повторяемости для ДМНА (таблица 1), %;

0,01 - коэффициент пересчета процентов;

$\bar{X}_{ДМН.1}$ - массовая концентрация ДМНА в двух параллельных пробах, мг/кг.

$$r_{\text{абсДМН}} = r_{\text{ДЭНА}} \times 0,01 \times \bar{X}_{\text{ДЭНА}} \quad (26)$$

где

$r_{\text{ДЭНА}}$ - относительное значение предела повторяемости для ДЭНА (таблица 1), %;

0,01 - коэффициент пересчета процентов;

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

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

$$|X_{I \text{ ДМН.обр}} - X_{II \text{ ДМН.обр}}| \leq r_{\text{абсДМН}} \quad (27)$$

$$|X_{I \text{ ДЭНА.обр}} - X_{II \text{ ДЭНА.обр}}| \leq r_{\text{абсДЭНА}}, \quad (28)$$

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

Если значение абсолютного расхождения между двумя результатами параллельных измерений массовой концентрации ДМНА или ДЭНА превышает значение $r_{\text{абс}}$, 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 $\bar{X}_{\text{окжДМН.1}}$ и $\bar{X}_{\text{окжДЭНА.1}}$.

$$|X_{\max \text{ ДМН.1}} - X_{\min \text{ ДМН.1}}| \leq CR_{0,95 \text{ ДМН.1}} \quad (29)$$

$$|X_{\max \text{ ДЭНА.1}} - X_{\min \text{ ДЭНА.1}}| \leq CR_{0,95 \text{ ДЭНА.1}} \quad (30)$$

$$CR_{0,95 \text{ ДМН.1}} = 0,01 \cdot \bar{X}_{\text{окжДМН.1}} \cdot 3,6 \cdot \sigma_{\text{ДМН.1}} \quad (31)$$

$$CR_{0,95 \text{ ДЭНА.1}} = 0,01 \cdot \bar{X}_{\text{окжДЭНА.1}} \cdot 3,6 \cdot \sigma_{\text{ДЭНА.1}} \quad (32)$$

где

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

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

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

$\bar{X}_{\text{окжДМН.1}}, \bar{X}_{\text{окжДЭНА.1}}$ - средние арифметические четырех результатов измерений, рассчитываемые по формулам

$$\bar{X}_{\text{окжДМН.1}} = \frac{\sum_{i=1}^4 X_{i \text{ ДМН.1}}}{4} \quad (33)$$

$$\bar{X}_{\text{окжДЭНА.1}} = \frac{\sum_{i=1}^4 X_{i \text{ ДЭНА.1}}}{4} \quad (34)$$

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 $\bar{X}_{\text{ДМН}} \text{ и } \bar{X}_{\text{ДЭН}}$

$$\bar{\bar{X}}_{\text{ДМН}} = \frac{\bar{X}_{I,\text{ДМН}} + \bar{X}_{II,\text{ДМН}}}{2} \quad (35)$$

где

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

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

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

$$\bar{\bar{X}}_{\text{ДЭН}} = \frac{\bar{X}_{I,\text{ДЭН}} + \bar{X}_{II,\text{ДЭН}}}{2} \quad (36)$$

где

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

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

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

Рассчитывают абсолютные разности результатов $\bar{X}_{I,\text{ДМН}}, \bar{X}_{II,\text{ДМН}}$ и $\bar{X}_{I,\text{ДЭН}}, \bar{X}_{II,\text{ДЭН}}$ и сравнивают их со значением критической разности $CR_{\text{абс}}$

$$CR_{\text{абсДМН}} = CR_{0.95,\text{ДМН}} \cdot 0.01 \cdot \bar{\bar{X}}_{\text{ДМН}} \quad (37)$$

$$CR_{\text{абсДЭН}} = CR_{0.95,\text{ДЭН}} \cdot 0.01 \cdot \bar{\bar{X}}_{\text{ДЭН}} \quad (38)$$

$$CR_{0.95,\text{ДМН}} = \sqrt{r_{(тот),\text{ДМН}}^2 - \frac{r_{\text{ДМН}}^2}{2}} \quad (39)$$

где

$r_{(тот),\text{ДМН}}$ - относительный предел промежуточной прецизионности для ДМНА, указанный в таблице 1, %;

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

$$CR_{0.95,\text{ДЭН}} = \sqrt{r_{(тот),\text{ДЭН}}^2 - \frac{r_{\text{ДЭН}}^2}{2}} \quad (40)$$

где

$r_{(тот),\text{ДЭН}}$ - относительный предел промежуточной прецизионности для ДЭНА, указанный в таблице 1, %;

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

Если для значения абсолютных расхождений между результатами выполняются условия

$$|X_{I,\text{ДЭНА}} - X_{II,\text{ДЭНА}}| \leq CR_{\text{абс,ДЭНА}} \quad (41)$$

$$|X_{I,\text{ДЭНА}} - X_{III,\text{ДЭНА}}| \leq CR_{\text{абс,ДЭНА}}, \quad (42)$$

то конечные результаты, полученные в условиях промежуточной прецизионности, считаются приемлемыми и средние значения $\bar{X}_{\text{ДЭНА}}$ и $\bar{X}_{\text{ДЭНА}}$, 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 (Rec) производят по следующим формулам:

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

где

$\bar{X}_{\text{обДМН.1}}$ - среднее содержание ДМНА в пробе с добавкой, мг/кг;

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

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

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

где

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

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

$X_{II,\text{контрДМН.1}}$ - содержание ДМНА во второй параллельной пробе без добавки, мг/кг.

$$X_{\text{обб.измДМН.1}} = \bar{X}_{\text{обДМН.1}} - \bar{X}_{\text{контрДМН.1}} \quad (45)$$

где

$X_{\text{обб.измДМН.1}}$ - величина добавки ДМНА, полученная экспериментально, мг/кг.

$$Rec_{\text{ДМН.1}} = \frac{X_{\text{обб.измДМН.1}}}{X_{\text{обб.теорДМН.1}}} \times 100 \quad (46)$$

где

$Rec_{\text{ДМН.1}}$ - степень извлечения ДМНА из образца, %.

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

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

где

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

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

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

$$\bar{X}_{\text{контр.ДЭН}} = \frac{X_{I \text{ контр.ДЭН}} + X_{II \text{ контр.ДЭН}}}{2} \quad (48)$$

где

$\bar{X}_{\text{контр.ДЭН}} - \text{среднее содержание ДЭНА в пробе без добавки, мг/кг;}$

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

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

$$X_{\text{добавл.ДЭН.1}} = \bar{X}_{\text{обр.ДЭН.1}} - \bar{X}_{\text{контр.ДЭН.1}} \quad (49)$$

где

$X_{\text{добавл.ДЭН.1}} - \text{величина добавки ДЭНА, полученная экспериментально.}$

$$\text{Rec}_{\text{ДЭН.1}} = \frac{X_{\text{добавл.ДЭН.1}}}{X_{\text{ добавл.теор.ДЭН.1}}} \times 100 \quad (50)$$

где

$\text{Rec}_{\text{ДЭН.1}} - \text{степень извлечения ДЭНА из образца, \%.$

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

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

$$s_r = \sqrt{\frac{L}{\sum_{i=1}^L w_i}} / (L \cdot d_2) = \bar{w}/d_2, \quad (52)$$

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

$$(X_{\text{дмна+дэна}} \pm U(X_{\text{дмна+дэна}})), \text{ мг/кг} \quad (53)$$

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

$U(X_{\text{дмна+дэна}})$ – 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 исследований, 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)

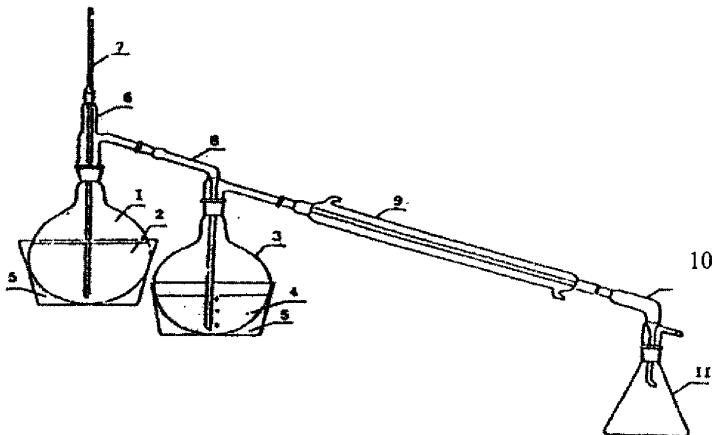


Рисунок А.1. Схема установки для перегонки с водяным паром для выделения летучих НА из пробы.

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