«СОГЛАСОВАНО»

Первый заместитель директора

Бел ГИМ

_____В.П.ЛОБКО

«_1_»_____2004 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

_____М.И. РИМЖА

«25»_____2004 г.

# МЕТОДИКА
# ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ В ОБОГАЩЕННЫХ ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

МВИ. МН 2146-2004

Минск 2004

СОДЕРЖАНИЕ


| | | |
|---|---|---|
| 1 | Область применения | 3 |
| 2 | Нормы погрешности измерений | 3 |
| 3 | Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы | 3 |
| 4 | Метод измерения | 5 |
| 5 | Требования безопасности | 5 |
| 6 | Требования к квалификации оператора | 5 |
| 7 | Условия выполнения измерений | 5 |
| 8 | Подготовка к выполнению измерений | 5 |
| 9 | Выполнение измерений | 11 |
| 10 | Обработка результатов измерений | 11 |
| 11 | Оформление результатов испытаний | 11 |
| 12 | Контроль погрешности методики выполнения измерений | 11 |
| | Приложение 1 | 16 |
| | Приложение 2 | 17 |

## 1 Область применения

Настоящая методика предназначена для определения содержания фолиевой кислоты в обогащенных плодоовощных, хлебобулочных, молочных и мясных продуктах.

Фолиевая кислота (птероил-L-глютамин) $C_{19}H_{19}N_7O_6$. М.в.=441,4, представляет собой мелкокристаллический порошок желтого цвета без запаха и вкуса, практически нерастворим в воде, 95%-ном спирте и органических растворителях. Хорошо растворим в разбавленных едких щелочах. На свету разлагается.

Метод определения основан на извлечении внесенной в продукт фолиевой кислоты 0,001М раствором NaOH с последующим анализом аликвотной части щелочного раствора методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в режиме градиентного элюирования на колонке с обращенной фазой ($C_{18}$) с использованием спектрофотометрического или диодно-матричного детектора.

Нижний предел измерения составляет 0,25 мкг/мл анализируемого раствора. Интервал определяемых концентраций 15-300 мкг/100г продукта.

## 2 Нормы погрешности измерений

При доверительной вероятности p=0,95 относительная суммарная погрешность измерения, границы неисключенных систематических погрешностей, доверительные границы случайной погрешности МВИ в диапазоне определяемых концентраций 25-300 мкг/100г приведены в таблице 1.

Таблица 1- Нормы погрешности измерений

| Определяемый показатель | Доверительные границы случайной погрешности МВИ, % | Неисключенная систематическая составляющая погрешности МВИ, % | Относительная суммарная погрешность МВИ, % |
|---|---|---|---|
| Фолиевая кислота | 9,0 | 1,8 | 18,0 |

## 3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

### 3.1 Средства измерений

| | |
|---|---|
| Жидкостной хроматограф фирмы «Hewelett Packard» со спектрофото-метрическим или диодно-матричным детектором | |
| Кран дозатор с петлей на 0,02 см$^3$ | Reodyne (погрешность 1,0% согласно руководству по эксплуатации жидкостного хроматографа |
| Баня водяная с обогревом, позволяющая поддерживать температуру от 0 до 100°С с погрешностью ±2°С. | |

| | | |
|---|---|---|
| Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200г | | ГОСТ 24104-2001 |
| Колбы мерные | 2-50-2<br>2-100-2<br>2-250-2<br>2-1000-2 | ГОСТ 1770-74Е |
| Стакан химический | -1-250 | ГОСТ 1770-74 |
| Пипетки градуированные | 1-1-1-0,5<br>1-1-2-1<br>1-1-2-5<br>1-2-2-10 | ГОСТ 29227-91 |
| Цилиндры мерные на 100см$^3$ | | ГОСТ 1770-74Е |

### 3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

| | |
|---|---|
| Колонка хроматографическая размером 4,6х150 мм, зернение частиц 5 мкм | Hypersil ODS ($C_{18}$) |
| Центрифуга лабораторная, обеспечивающая скорость вращения до 6 тыс. об/мин | Beckman J6-HC |
| Перемешивающее устройство ПЭ-6410 | АО «Экрос» г. С.-Петербург |
| Фильтр «синяя лента» | ГОСТ 12026-76 |
| Плитка электрическая | ГОСТ 14919-83Е |
| Фильтр стеклянный пористый (Пор16) | ГОСТ 23932-90 |

### 3.3 Реактивы, материалы и растворы

| | |
|---|---|
| Фолиевая кислота, х.ч. | Фирма Merck, 99,5% чистоты |
| Кислота соляная, х.ч., водный раствор концентрации 10% | ГОСТ 3118-77 |
| Кислота серная, ч.д.а. или х.ч. | ГОСТ 4204-77 |
| Вода бидистиллированная | |
| Ацетонитрил, ч. или для HPLC | ТУ 6-09-3534-74 |
| Натрий хлористый, х.ч., водный раствор концентрации 15% | ГОСТ 4233-77 |
| Натрий уксуснокислый 3-водный, ч.д.а. или х.ч., насыщенный водный раствор | ГОСТ 199-78 |
| Натрия гидроокись, ч.д.а. или х.ч., водный раствор молярной | ГОСТ 4328-77 |

| | |
|---|---|
| концентрации 0,01 М и водный раствор нормальной концентрации 2н | |
| Кислота трихлоруксусная, ч., водный раствор концентрации 50 г/см$^3$ | ТУ 6-09-1926-77 |
| Анионит ФИБАН А-6 | ТУ РБ 100185198.073-2003 |

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

**4 Метод измерения**

Для определения фолиевой кислоты в обогащенных продуктах питания используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанный на измерении оптической плотности экстракта фолиевой кислоты с использованием спектрофотометрического или диодно-матричного детектора при длине волны 286 нм и ширине оптической полосы 20 нм после градиентного элюирования экстракта на хроматографической колонке Hypersil ODS ($C_{18}$).

**5 Требования безопасности**

Анализ по данной методике должен выполнятся согласно инструкции «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях». – М.: Химия, 1979 г.

**6 Требования к квалификации оператора**

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

**7 Условия выполнения измерений**

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха 20±5°С;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25°С;
- напряжение питающей сети 220±22В;
- частота переменного тока 50±1Гц

**8 Подготовка к выполнению измерений**

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, построение

градуировочного графика, отбор и подготовка проб к анализу.

**8.1 Подготовка измерительной аппаратуры**

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для блока насосов и детектора. Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 30-40 мин. Условием стабильности является дрейф нулевого сигнала (не превышающий 1-2% от шкалы регистрации сигнала 0,1-0,05 единиц оптической плотности).

**8.2 Приготовление растворов и реактивов**

*8.2.1 Приготовление водного раствора 0,01М NaOH*

Взвешивают 0,40 ± 0,001г NaOH на весах 2-го класса точности, растворяют в 300-500 $см^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Годен в течение 1 месяца.

*8.2.2 Приготовление водного раствора 2н NaOH*

Взвешивают 80 ± 0,001г NaOH на весах 2-го класса точности, растворяют в 300-500 $см^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Годен в течение 2 месяцев.

*8.2.3 Приготовление 10% водного раствора соляной кислоты (10% HCl)*

23,9 $см^3$ концентрированной соляной кислоты плотностью 1,185 г/$см^3$ помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят до метки дистиллированной водой. Годен в течение 2 месяцев.

*8.2.4 Приготовление15% водного раствора хлористого натрия (15% NaCl)*

Взвешивают 15 ±0,001г NaCl на весах 2-го класса точности и растворяют в 85 $см^3$ дистиллированной воды. Годен в течение 1 месяца.

*8.2.5 Приготовление насыщенного раствора уксуснокислого натрия*

Взвешивают 100,0±0,001 г уксуснокислого натрия и растворяют в 50-100 $см^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 250 $см^3$, доводят объем до метки и перемешивают. Годен в течение 2 месяцев.

*8.2.6 Приготовление раствора трихлоруксусной кислоты массовой концентрации 50 г/$см^3$*

Взвешивают 50,0±0,001 г трихлоруксусной кислоты и растворяют в 30-40 $см^3$ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Годен в течение 2 месяцев.

*8.2.7 Получение бидистиллированной воды*

Собирают установку для дистилляции воды состоящую из круглодонной колбы (объем 2 $дм^3$), прямого холодильника и приемной колбы. В круглодонную колбу наливают

1,5 $дм^3$ дистиллированной воды, добавляют 10 г $KmnO_4$ и центры кипения. Нагревание воды производят на электрической плитке с закрытой спиралью. Полученную бидистиллированную воду хранят в полиэтиленовых бутылях не более 1 месяца.

**8.3 Приготовление подвижной фазы**

Для приготовления подвижной фазы (системы элюентов), используют бидистиллированную воду (pH=2,9) и ацетонитрил. Для установления pH=2,9 используют раствор серной кислоты 1:10. Измеряют pH водного раствора с использованием иономера.

**8.4 Приготовление градуировочных растворов**

*8.4.1 Приготовление основного стандартного раствора фолиевой кислоты 2000 мкг/см$^3$.*

Готовят основной стандартный раствор фолиевой кислоты концентрацией 2000 мкг/см$^3$, взвешивая 200 мг фолиевой кислоты с точностью ± 0,15мг и растворяя в мерной колбе на 100 см$^3$ раствором 0,01М NaOH.

*8.4.2 Приготовление рабочего стандартного раствора фолиевой кислоты 200 мкг/см$^3$.*

Из основного стандартного раствора фолиевой кислоты готовят рабочий стандартный раствор фолиевой кислоты концентрацией 200 мкг/см$^3$. Для этого отбирают 10 см$^3$ основного стандартного раствора, переносят в мерную колбу на100 см$^3$ и доводят раствором 0,01М NaOH до метки.

*8.4.3 Приготовление градуировочных растворов фолиевой кислоты.*

Градуировочные растворы фолиевой кислоты готовят по схеме, представленной в таблице 1. Аликвотные части рабочего стандартного раствора фолиевой кислоты переносят в мерные колбы объемом 100см$^3$ и доводят до метки 0,01М NaOH.

Таблица 1 – Схема приготовления градуировочных растворов фолиевой кислоты

| № градуировочного раствора | Концентрация фолиевой кислоты в градуировочном растворе, мкг/см$^3$ | Аликвотная часть рабочего стандартного раствора фолиевой кислоты, см$^3$ |
|---|---|---|
| 1 | 0,5 | 0,25 |
| 2 | 1,0 | 0,5 |
| 3 | 2,0 | 1,0 |
| 4 | 4,0 | 2,0 |
| 5 | 6,0 | 3,0 |

Каждый градуировочный раствор готовится и хроматографируется не менее трех раз с интервалом в 1 день.

**8.5 Установление градуировочной характеристики**

Каждый градуировочный раствор хроматографируют по два раза начиная с самой низкой концентрации, принимая за результат измерения среднее арифметическое двух

параллельных измерений. Условия хроматографирования при анализе фолиевой кислоты:

| | |
|---|---|
| Объем вводимой пробы | 0,02 $см^3$ |
| Состав подвижной фазы: ацетонитрил - вода с pH=2,9 и градиентным элюированием в соотношении от 5% до 80% ацетонитрила в течение 13 минут. | |
| Скорость потока элюента | 0,5 мл/мин |
| Колонка хроматографическая Hypersil BDS ($C_{18}$), размером 4,0x120мм; зернение частиц 5 мкм | |
| Длина волны поглощения | 286 нм |
| Ширина полосы поглощения | 20 нм |
| Время удерживания фолиевой кислоты | 11-12 мин |

Условия градиентного элюирования

| Время анализа, мин | Соотношение буферов, % | |
|---|---|---|
| | А – бидистиллированная вода (pH=2,9) | В - ацетонитрил |
| 0 | 95 | 5 |
| 5 | 95 | 5 |
| 10 | 70 | 30 |
| 13 | 20 | 80 |
| 20 | 95 | 5 |

**8.6 Построение градуировочного графика**

Для построения градуировочного графика измеряют площади пиков, соответствующие концентрации фолиевой кислоты в градуировочных растворах. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии $a$ и $b$ прямой $Y = aX + b$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения $Y = aX + b$ где

$Y$- площадь пика фолиевой кислоты;

$X$- концентрация фолиевой кислоты в градуировочном растворе;

$a$ и $b$- коэффициенты регрессии.

**8.7 Контроль градуировочного графика**

Контроль градуировочного графика осуществляется по градуировочным растворам фолиевой кислоты. Для контроля должны применяться растворы с концентрацией фолиевой кислоты, входящей в диапазон измерений, но не повторяющие по значениям концентрации, по которым рассчитывались параметры градуировочной прямой. Допустимые расхождения между заданными и установленными по графику значениями концентраций используемых для контроля градуировочных растворов не должны превышать 1,0 %. В противном случае график подлежит повторной перепроверке и, при

необходимости, новому расчету параметров градуировочной прямой. График подлежит обязательной проверке при замене партии реактивов и посуды, после ремонта оборудования, но не реже одного раза в месяц.

*8.7.1 Оперативный контроль градуировочного графика*

Для оперативного контроля градуировочного графика перед началом измерений используется 1-2 градуировочных раствора из диапазона измерений фолиевой кислоты. Полученные при хроматографировании значения *Y* не должны отклоняться от градуировочной прямой более чем на величину доверительной границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика *E*= 2,8 %.

В противном случае график подлежит повторной перепроверке по п.8.5.1.

**8.8 Подготовка картриджа**

Подготовка картриджа к анализу осуществляется следующим образом:

-0,5 г сухого анионита помещается в стеклянную или тефлоновую колонку с диаметром 8-10 мм. Колонка заполняется 10% раствором соляной кислоты и выдерживается 15-20 мин, затем кислота вымывается дистиллированной водой до нейтральной реакции промывной воды. Далее колонка заполняется раствором 2 н NaOH и выдерживается 15-20 мин, затем отмывается от щелочи дистиллированной водой до нейтральной реакции промывной воды. После этого колонка снова заполняется 10% раствором соляной кислоты и выдерживается 15-20 мин, затем промывается дистиллированной водой до нейтральной реакции промывной воды. В подготовленный таким образом картридж вносится экстракт и элюируется со скоростью 1 капля в секунду.

**8.9 Подготовка анализируемых образцов**

Масса навески анализируемого продукта должна быть взята с таким расчетом, чтобы в конечном экстракте содержание фолиевой кислоты было не ниже предела чувствительности метода – 0,25 мкг/мл. Рекомендуемая величина навески:

-при внесении фолиевой кислоты 15-25 мкг/100г m=60 г

-при внесении фолиевой кислоты св. 25-50 мкг/100г m=40-50 г

-при внесении фолиевой кислоты св. 50-100 мкг/100г m=20-30г

-при внесении фолиевой кислоты св. 100 мкг/100г m=10-15г

**8.9.1 Пробоподготовка плодоовощной продукции и хлебобулочных изделий**

Предварительно измельченная навеска (20-30 г) помещается в коническую колбу, вместимостью 250 см$^3$, прибавляется 100 см$^3$ экстрагирующего раствора (0,01М раствор NaOH), тщательно перемешивается. Затем колба устанавливается на перемешивающее устройство для экстракции. Время экстракции 60 мин. Содержимое конической колбы переносится количественно в мерную колбу объемом 200 см и доводится

экстрагирующим раствором до метки. Полученный экстракт переносится в центрифужные стаканы объемом 250 см$^3$. Вес стаканов уравновешивается с точностью до 0,05 г. Стаканы устанавливаются в лабораторную центрифугу для центрифугирования. Условия центрифугирования: скорость - 5 - 5,5 тыс. оборотов в мин.; время – 20 мин.

Надосадочную жидкость дополнительно фильтруют через бумажный фильтр (синяя лента). 50 см$^3$ полученного экстракта пропускают через картридж, заполненный анионитом ФИБАН А-6.

Элюируют фолиевую кислоту из картриджа 7 см$^3$ 15% раствора NaCl.

Для ввода в хроматограф используют полученный раствор в количестве 20 мкл.

**8.9.2 Пробоподготовка молока и молочных продуктов**

Проба (40-60 см$^3$) помещается в мерную колбу вместимостью 100 см$^3$, добавляется ацетонитрил в количестве 40 см$^3$, интенсивно перемешивается в течение 1-2 мин, затем до метки доводится ацетонитрилом. Через 15-20 мин полученный экстракт количественно переносится в центрифужные стаканы объемом 250 см$^3$. Вес стаканов уравновешивается с точностью до 0,05 г. Стаканы устанавливаются в лабораторную центрифугу для центрифугирования. Условия центрифугирования: скорость - 5 - 5,5 тыс. оборотов в мин.; время – 20 мин.

Надосадочную жидкость дополнительно фильтруют через бумажный фильтр (синяя лента). 50 см$^3$ полученного экстракта пропускают через картридж, заполненный анионитом ФИБАН А-6.

Элюируют фолиевую кислоту из колонки 7 см$^3$ 15% раствора NaCl. Для ввода в хроматограф используют полученный раствор в количестве 20 мкл.

**8.9.3 Пробоподготовка мясных изделий**

Навеска (10-15г) отбирается из тщательно гомогенизированного образца, помещается в коническую колбу объемом 250 см$^3$ и добавляется 150 см$^3$ 0,1н раствора соляной кислоты. Колба помещается на водяную баню и кипятится в течение 30 мин, затем охлаждается под струей холодной воды до температуры 20 ± 2°С, добавляется 5 см$^3$ насыщенного раствора натрия уксуснокислого и 5 см$^3$ 50% раствора трихлоруксусной кислоты (для осаждения белков и других посторонних примесей). Содержимое колбы количественно переносится в мерную колбу объемом 250 см$^3$, доводится водой до метки и фильтруется. Отбирается 50-100 см$^3$ фильтрата и доводится раствором 2н NaOH до pH=7 (контроль по лакмусовой бумаге). Полученный экстракт пропускается через колонку, заполненную анионитом ФИБАН А-6. Элюируется фолиевая кислота из колонки 7 см$^3$ 15% раствора NaCl с pH=9. Для ввода в хроматограф используется полученный элюат в количестве 20 мкл.

**9 Выполнение измерений**

Анализ полученных экстрактов проводится на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования такие же, как и при построении градуировочного графика п. 8.5. Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб. Каждую пробу хроматографируют не менее двух раз.

**10 Обработка результатов измерений**

Расчет концентрации фолиевой кислоты (мкг/100г продукта) проводится по формуле:

$$X = \frac{C * V_{элюат} * V_1 * 100}{V_2 * m}, \text{ где}$$

С – концентрация фолиевой кислоты, найденная по градуировочному графику;

$V_{элюат}$ – объем элюата, пропущенного через картридж, $см^3$ (7);

$V_1$ – общий объем экстракта, $см^3$ (250);

$V_2$ – объем экстракта, взятого для пропускания через картридж, $см^3$ (50);

m – масса навески, г;

100 – расчет на 100 г продукта.

**11 Оформление результатов испытаний**

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

Результаты должны включать следующую информацию:

- Наименование (шифр) пробы;
- Дату проведения измерений;
- Результаты измерений, включая все необходимые данные и промежуточные расчеты;
- Результаты параллельных определений;
- Окончательный результат измерений;
- Значение приписанной или рассчитанной погрешности измерения или ее составляющих;
- Фамилию оператора.

**12 Контроль погрешности методики выполнения измерений**

Контроль погрешности МВИ осуществляется с целью оперативной информации о качестве измерений рабочих проб и для принятия оперативных мер, предупреждающих ухудшение точности результатов.

В процессе внутреннего оперативного контроля определяются показатели сходимости, воспроизводимости и точности.

**12.1 Средства контроля погрешности методики выполнения измерений**

В качестве средств контроля в процессе определения показателей качества результатов анализа применяются:

- рабочие пробы – для определения показателей сходимости и воспроизводимости;
- рабочие пробы с добавкой – при определении показателей точности.

Результаты контроля воспроизводимости и точности фиксируются в соответствии с установленной системой регистрации контроля правильности выполнения измерений, результаты контроля сходимости выполняются для каждого анализа и фиксируются в рабочих журналах исполнителей.

**12.2 Порядок проведения контроля сходимости**

Контроль сходимости результатов измерений проводится при получении каждого результата измерения, предусматривающего проведение параллельных определений.

Контроль сходимости результатов параллельных определений фолиевой кислоты проводят путем сравнения расхождения между результатами параллельных определений, выраженного в процентах по отношению к среднему значению, с нормативом сходимости $d$, приведенному в таблице 2.

$d_K$ рассчитывается по формуле: $d_K = \frac{(C_{max} - C_{min}) \times 100}{C_{cp}} \leq d$ где:

- $d$ - норматив сходимости параллельных определений %;
- $d_K$ - найденное расхождение между двумя результатами, %;
- $C_{max}$ – максимальный результат определения;
- $C_{min}$ – минимальный результат определения;
- $C_{cp}$ – среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

Если $d_K \leq d$, то сходимость результатов параллельных определений признают удовлетворительной, и по ним может быть вычислен результат измерений при рабочем или контрольном измерении. При превышении норматива сходимости определений эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

**12.3 Порядок проведения контроля воспроизводимости**

Контроль воспроизводимости результатов измерений проводится не реже 2-3 раз в месяц с использованием рабочих проб. Контроль воспроизводимости обязателен при

смене партии реактивов, посуды, после ремонта оборудования, существенных изменений условий выполнения измерений.

Контроль воспроизводимости проводится путем сравнения результата контрольной процедуры $D_K$ , равного расхождению двух результатов измерений – первичного и повторного – содержания фолиевой кислоты в одной и той же рабочей пробе с нормативом воспроизводимости $D$, приведенным в приложении 1.

Первичный и повторный результат измерений должен быть получен в разных условиях, например, двумя операторами в один день или одним оператором в два последующих дня и т.д.

$D_K$ рассчитывается по формуле: $D_K = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_{ср}} \leq D$, где:

- $D$ - норматив воспроизводимости результатов измерения, %;
- $D_K$ – найденное расхождение между двумя результатами измерения концентраций фолиевой кислоты, %;
- $C_1$ – результат первичного измерения концентрации фолиевой кислоты;
- $C_2$ – результат повторного измерения концентрации фолиевой кислоты;
- $C_{ср}$ – среднее значение результатов двух измерений концентраций фолиевой кислоты.

Величины $C_1$ и $C_2$ должны быть получены с соблюдением условий сходимости.

Если $D_K \leq D$, то воспроизводимость контрольных измерений признается удовлетворительной. В этом случае воспроизводимость результатов измерений рабочих проб, полученных в условиях, соответствующих условиям МВИ, признается удовлетворительной.

В случае превышения норматива воспроизводимости, когда $D_K > D$, контроль повторяют. При повторном превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля воспроизводимости.

**12.4 Порядок проведения контроля точности**

Контроль точности результатов измерений осуществляется с использованием метода добавок. Образцами для контроля точности являются рабочие пробы и эти же пробы с добавкой фолиевой кислоты.

К пробе с добавкой предъявляются следующие требования:

- добавка должна вводится в пробу на самой ранней стадии измерений (стадия взятия пробы) в целях проведения пробы с добавкой через все последующие стадии пробоподготовки и анализа.

*Примечание*: в целях уменьшения погрешности за счет неоднородности распределения вводимой добавки целесообразно рассчитанное количество добавки вносить непосредственно в подготовленную навеску пробы;

- количество вводимой добавки должно составлять 50-150% от установленного содержания фолиевой кислоты в пробе;
- проба с введенной добавкой не должна выходить за верхнюю границу определяемых концентраций фолиевой кислоты согласно МВИ.

В качестве добавки используются водные растворы фолиевой кислоты необходимой концентрации. Расчет необходимой концентрации фолиевой кислоты производится исходя из того, что в навеску должно вноситься около 10 $см^3$ раствора для получения пробы с добавкой в диапазоне 50-150% ранее установленного содержания фолиевой кислоты в пробе.

После внесения добавки проба выдерживается 5-10 мин, а затем анализируется в соответствии с МВИ.

Контроль точности проводится по результатам измерений пробы до введения добавки ($X_{пр}$) и после введения добавки фолиевой кислоты ($X_{пр.доб.}$) концентрацией $C_{доб}$ в исходную пробу. Разница ($K_K$) между найденной ($X_{доб}=X_{пр.доб}-X_{пр}$) и введенной $C_{доб}$ концентрацией добавки не должна превышать по абсолютной величине значения норматива точности К.

Значения $K_K$ и К рассчитываются по формулам:

$K_K=|X_{пр.доб}-X_{пр}-C_{доб}|$, где:

$K_K$ – рассчитанный параметр точности;

$X_{пр.доб}$ – содержание фолиевой кислоты в пробе с добавкой, мкг;

$X_{пр}$ – содержание фолиевой кислоты в исходной пробе, мкг;

$C_{доб}$- величина введенной добавки, мкг .

К=1,41Δ - для доверительной вероятности Р=0,95;

К=1,19Δ - для доверительной вероятности Р=0,90, где

Δ - погрешность МВИ.

В том случае, когда погрешности определения фолиевой кислоты в исходной пробе и пробе с добавкой различаются более чем на 30 %, для расчета норматива точности используется следующая формула:

$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta X_{пр})^2 + (\Delta X_{пр.доб})^2}$ - для доверительной вероятности Р=0,90;

$K = \sqrt{(\Delta X_{пр})^2 + (\Delta X_{пр.доб})^2}$ - для доверительной вероятности Р=0,95 где

К – норматив точности;

$\Delta X_{пр}$- погрешность определения содержания фолиевой кислоты в исходной пробе;

$\Delta X_{пр.доб}$- погрешность определения содержания фолиевой кислоты в пробе с добавкой.

Если для расчета используются относительные значения погрешностей $\Delta_{отн}$, $\Delta X_{пр.отн}$, $\Delta X_{пр.доб.отн}$, то относительное значение $K_{К\ отн}$ рассчитывается по формуле:

$$K_{Котн} = \frac{K_K}{C_{доб}}$$, где

$K_K$ – абсолютное значение ;

$C_{доб}$ – значение добавки введенной в исходную пробу.

Точность контрольных измерений, а также точность результатов измерений рабочих проб, выполненных в условиях соблюдения требований МВИ, признается удовлетворительной, если $|K_K| \leq K$.

Если $|K_K| > K$, то точность контрольных измерений признается неудовлетворительной и процедура повторяется с использованием другой рабочей пробы. При повторном получении неудовлетворительных результатов контроля точности, выясняют и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительному контролю.

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

Разработчики:

| | |
|---|---|
| Зав. лабораторией ХПП, к.х.н. | О.В. Шуляковская |
| ст.н.с. | Л.Л. Белышева |
| н.с. | О.В. Воронцова |
| мл.н.с. | Е.И. Полянских |

**Приложение 1**
(обязательное)

Значения точностных параметров методики

| | | |
|---|---|---|
| Число параллельных определений | **n** | 2 |
| Границы суммы неисключенной систематической погрешности | $Q_i$, % | 1,8 |
| Погрешность градуировочного графика | $\Delta_{гр}$, % | 1,0 |
| Доверительные границы случайной составляющей погрешности градуировочного графика | $E_y$ | 2,8 |
| Норматив сходимости | d, % | 10,0 |
| Норматив воспроизводимости | D, % | 25,0 |
| Норматив точности | K,% | 25,5 |
| Относительная суммарная погрешность результата измерения | Δ, % | 18,0 |
| Допустимые расхождения между результатами в разных лабораториях | % | 36,0 |

**Приложение 2**
(информационное)

**Перечень используемой документации**

В настоящей методике использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 199-78 Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия.

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 3118-77 Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4204-77 Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4212-76 Реактивы. Приготовление растворов для колориметрического и нефелометрического анализа

ГОСТ 61-75 Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 4166-76 Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4233-77 Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29227-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования