

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ

СОГЛАСОВАНО

УТВЕРЖДАЮ

Зам. ~~Директора~~ Бсл ГИМ



А. Коломиец

2010г.

Заместитель Министра
Заведующий государственный врач Республики
Беларусь



В.И. Качан

2010г.

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

МВИ.МН 3543-2010

МВИ аттестована
ГУП "Белорусский государственный
институт метрологии"

Свидетельство об аттестации

№ 585/2010
от "24" 08 2010 г.

Директор ГУ «РНЦ гигиены»
профессор



В.П. Филонов

2010г.

Минск 2010

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ

СОГЛАСОВАНО

Зам. директора Бел ГИМ

_____ Т.А. Коломисц

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

Диэтилнитрозамин – маслянистая жидкость, d^{20} 0,95, температура кипения – 176,9 $^{\circ}$ С, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. Структурная формула - $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N} - \text{N}=\text{O}$, 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, 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_{ITD} , %
			повторяемости S_r , %	промежуточной прецизионности S_{ITD} , %		
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 – флуориметрический 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 Н 07 ZP	Фирма Samsung
Водяная баня НВ4 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, $\rho=1,01$ г/см ³	фирма «Sigma», каталожный № N 7756
Диэтилнитрозамин, $\rho=0,95$ г/см ³	фирма «Sigma», каталожный № N 0756
Дипропилнитрозамин, 100мг	фирма «Supelco», каталожный № 48554
Метанол для ВЭЖХ $\geq 99,9\%$	фирма «Fluka»
Ацетон для ВЭЖХ $\geq 99,8\%$	фирма «Sigma-Aldrich»
Ацетонитрил для ВЭЖХ $\geq 99,9\%$	фирма «Sigma-Aldrich»
Бензол, $\geq 99,5\%$ для ВЭЖХ	фирма «Fluka»
Кислота уксусная, $\geq 99\%$	фирма «Sigma-Aldrich»
Бромистый водород в уксусной кислоте, $\geq 33\%$	фирма «Sigma-Aldrich» каталожный № 18735
Хлористый метилен, для ВЭЖХ	фирма «Merck»
Натрий сернокислый безводный, $\geq 99,0\%$	фирма «Sigma-Aldrich»
Дансилхлорид, 95%	фирма «Sigma», каталожный № D2625-1г
Кислота серная, 95-98%	фирма «Sigma-Aldrich»
Натрия гидроокись, $\geq 98\%$	фирма «Sigma-Aldrich»
Натрий углекислый кислый, 99,7-100,3%	фирма «Sigma-Aldrich»
Сульфаминовая или сульфаниловая кислота, $\geq 99,0\%$	фирма «Sigma-Aldrich»
Натрий хлористый, $\geq 99,5\%$	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 $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- температура воздуха при измерении $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа;
- влажность воздуха $(65 \pm 15)\%$ при температуре $25 ^\circ\text{C}$;
- напряжение питающей сети $(230 \pm 10) \text{ В}$;
- частота переменного тока $(50 \pm 0,4) \text{ Гц}$.

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 см³.

Навеску дансилхлорида 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 °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 (депротизирующий раствор)

В коническую колбу вместимостью 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 °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 рН – 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 °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 мкг 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, 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 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 дитиопроизводных 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°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 дансилхлорида, приготовленного по п. 8.2.1., перемешивают и немедленно переносят смесь в пробирку с притертой пробкой вместимостью 5 см³. Плотную закрытую пробирку помещают в водяную баню с температурой 55°C 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 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 шлифованной 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 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 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 ацетоннитрил-вода в объемном соответствии 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 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 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 $\bar{K}_{отн}$ для каждой концентрации ДМНА и ДЭНА относительно внутреннего стандарта с концентрацией 2,00 мкг/см³ по формулам (1) – (6), средние значения коэффициентов $\bar{K}_{отн}$ рассчитывают по формулам (7), (8) для каждого определяемого НА (ДМНА и ДЭНА) во всем диапазоне измерений.

$$\bar{S}_{ДМНА, хол} = \frac{\sum_{j=1}^3 S_{jДМНА, хол}}{3}, \quad (1)$$

где

$\bar{S}_{ДМНА, хол}$ - средняя площадь пика ДМНА в холостой пробе;

$S_{jДМНА, хол}$ - площадь пика ДМНА при j-ом измерении холостой пробы.

$$\bar{S}_{ДЭНА, хол} = \frac{\sum_{j=1}^3 S_{jДЭНА, хол}}{3} \quad (2)$$

$\bar{S}_{ДЭНА, хол}$ - средняя площадь пика ДЭНА в холостой пробе;

$S_{jДЭНА, хол}$ - площадь пика ДЭНА при j-ом измерении холостой пробы.

$$K_{\text{относДМНА}} = \frac{C_{i, \text{ДМНА}} \cdot S_{\text{вн.ст}}}{C_{\text{вн.ст}} \cdot (S_{ij, \text{ДМНА}} - \bar{S}_{\text{ДМНА, кол}})} \quad (3)$$

где

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

$C_{i, \text{ДМНА}}$ - концентрация ДМНА в i -ом градуировочном растворе (таблица 3), мкг/см³;

$S_{ij, \text{ДМНА}}$ - площадь пика ДМНА по результатам j -го измерения i -го градуировочного раствора;

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

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

$$\bar{K}_{\text{относДМНА}} = \frac{\sum_{j=1}^9 K_{\text{относДМНА}}}{9} \quad (4)$$

где

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

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

$$K_{\text{относДЭНА}} = \frac{C_{i, \text{ДЭНА}} \cdot S_{\text{вн.ст}}}{C_{\text{вн.ст}} \cdot (S_{ij, \text{ДЭНА}} - \bar{S}_{\text{ДЭНА, кол}})} \quad (5)$$

где

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

$C_{i, \text{ДЭНА}}$ - концентрация ДЭНА в i -ом градуировочном растворе (таблица 3), мкг/см³;

$S_{ij, \text{ДЭНА}}$ - площадь пика ДЭНА по результатам j -го измерения i -го градуировочного раствора;

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

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

$$\bar{K}_{\text{относДЭНА}} = \frac{\sum_{j=1}^9 K_{\text{относДЭНА}}}{9} \quad (6)$$

где

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

$$\overline{K}_{\text{отн.ДМНА}} = \frac{\sum_{i=1}^5 \overline{K}_{\text{отн.ДМНА}}}{5} \quad (7)$$

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

$$\overline{K}_{\text{отн.ДЭНА}} = \frac{\sum_{i=1}^5 K_{\text{отн.ДЭНА}}}{5} \quad (8)$$

$\overline{K}_{\text{отн.ДЭНА}}$ - 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 $K_{\text{пробн.ДМНА}}$ и $K_{\text{пробн.ДЭНА}}$ 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.

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

где

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

$K_{\text{пробн}}$ - 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 Подготовка 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 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. Далее 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 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. Плотную закрытую пробирку помещают в водяную баню с температурой 55°C 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 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 притертой 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 Подготовка 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 ДМНА 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.

$$C'_{\text{ДМНА, хол}} = \frac{C_{\text{вн. ст.}} \times S_{\text{ДМНА, хол}} \times \overline{K}_{\text{отн. ДМНА}}}{S_{\text{вн. ст., хол}}} \quad (10)$$

где

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

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

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

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

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

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

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

$$\bar{C}_{ДМНА,хол} = \frac{C_{ДМНА,хол1} + C_{ДМНА,хол2}}{2} \quad (11)$$

где

$\bar{C}_{ДМНА,хол}$ - 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.

$$C_{ДЭНА,хол} = \frac{C_{вт.ст.} \times S_{ДЭНА,хол1} \times \bar{K}_{отн.ДЭНА}}{S_{вт.ст.хол}} \quad (12)$$

где

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

$S_{ДЭНА,хол1}$ - площадь пика ДЭНА в холостой пробе по 1 хроматограмме;

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

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

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

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

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

$$\bar{C}_{ДЭНА,хол} = \frac{C_{ДЭНА,хол1} + C_{ДЭНА,хол2}}{2} \quad (13)$$

где

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

10.1.3 Расчет концентрации ДМНА в пробе образца

$$C_{1,ДМНА,обр1} = \frac{C_{вт.ст.} \times S_{1,ДМНА,обр1} \times \bar{K}_{отн.ДМНА}}{S_{1,вт.ст.обр1}} \quad (14)$$

где

$C_{1,ДМНА,обр1}$ - концентрация ДМНА в анализируемом образце первой параллели по 1 хроматограмме, мкг/см³;

$S_{1,ДМНА,обр1}$ - площадь пика ДМНА в исследуемом образце первой параллели по 1 хроматограмме.

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

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

$S_{I, вн.ст.хол}$ - 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: $C_{I, ДПНАобр2}$.

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

$$\overline{C}_{I, ДПНАобр} = \frac{C_{I, ДПНАобр1} + C_{I, ДПНАобр2}}{2} \quad (15)$$

где

$\overline{C}_{I, ДПНАобр}$ - среднее значение концентрации ДМНА в первой параллельной пробе образца, мкг/см³;

Содержание ДМНА в первом параллельном образце рассчитывают по формуле

$$X_{I, ДПНАобр} = \frac{(\overline{C}_{I, ДПНАобр} - \overline{C}_{ДПНАхол}) \times V}{P_I} \quad (16)$$

где

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

P_I - навеска образца первой параллельной пробы, г.

V - объем анализируемого экстракта, см³.

Аналогично рассчитывают содержание ДМНА для второго параллельного образца ($X_{II, ДПНАобр}$)

$$X_{II, ДПНАобр} = \frac{(\overline{C}_{II, ДПНАобр} - \overline{C}_{ДПНАхол}) \times V}{P_{II}} \quad (17)$$

где

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

$\overline{C}_{II, ДПНАобр}$ - среднее значение концентрации ДМНА во второй параллельной пробе образца, мкг/см³, 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:

$$\overline{X}_{ДМНА} = \frac{X_{I, ДПНАобр} + X_{II, ДПНАобр}}{2} \quad (18)$$

где

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

10.1.4 Расчет концентрации ДЭНА в пробе образца

$$C_{1, ДЭНА,обр1} = \frac{C_{вн.ст.} \times S_{1, ДЭНА,обр1} \times \overline{K}_{отн.СМН.1}}{S_{1, вн.ст.образ1}} \quad (19)$$

где

$C_{1, ДЭНА,обр1}$ - концентрация ДЭНА в анализируемой пробе образца первой параллели по 1 хроматограмме, мкг/см³;

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

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

$C_{вн.ст.}$ - концентрация внутреннего стандарта, мкг/см³;

$S_{1, вн.ст.образ1}$ - 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: $C_{1, ДЭНА,обр2}$.

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

$$\overline{C}_{1, ДЭНА,обр} = \frac{C_{1, ДЭНА,обр1} + C_{1, ДЭНА,обр2}}{2} \quad (20)$$

где

$\overline{C}_{1, ДЭНА,обр}$ - среднее значение концентрации ДЭНА в первой параллельной пробе образца, мкг/см³;

Содержание ДЭНА в первом параллельном образце рассчитывают по формуле

$$X_{1, ДЭНА,обр} = \frac{(\overline{C}_{1, ДЭНА,обр} - \overline{C}_{ДЭНА,хол}) \times V}{P_1} \quad (21)$$

где

$X_{1, ДЭНА,обр}$ - содержание ДЭНА в первом параллельном образце, мкг/г (мг/кг);

P_1 - навеска образца первой параллельной пробы, г

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

$$X_{II, ДЭНА,обр} = \frac{(\overline{C}_{II, ДЭНА,обр} - \overline{C}_{ДЭНА,хол}) \times V}{P_{II}} \quad (22)$$

где

$X_{II, ДЭНА,обр}$ - 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

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

где

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

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

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

Если массовая концентрация ДМНА или ДЭНА меньше предела измерения методики $C_{100\%ДМНА}$ или $C_{100\%ДЭНА}$ соответственно, то дают одностороннюю оценку массовой концентрации ДМНА или ДЭНА в пробе в виде $X_{ДМНА} < X_{100\%ДМНА}$ или $X_{ДЭНА} < X_{100\%ДЭНА}$ (значения $X_{100\%ДМНА}$, $X_{100\%ДЭНА}$ 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 $r_{абс.ДМНА}$, $r_{абс.ДЭНА}$, рассчитываемым по формулам

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

где

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

0,01 - коэффициент пересчета процентов;

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

$$r_{абс/СЭНА} = r_{н,ДЭНА} \times 0,01 \times \bar{X}_{ДЭНА} \quad (26)$$

где

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

0,01 - коэффициент пересчета процентов;

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

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

$$X_{I ДМНАобр} - X_{II ДМНАобр} \leq r_{абс,ДМНА} \quad (27)$$

$$X_{I ДЭНАобр} - X_{II ДЭНАобр} \leq r_{абс,ДЭНА}, \quad (28)$$

то два результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений массовой концентрации соответствующего НА указывают среднее значение $\bar{X}_{ДМНА}$ и $\bar{X}_{ДЭНА}$, 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 $\bar{X}_{окч,ДМНА}$ и $\bar{X}_{окч,ДЭНА}$.

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

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

$$CR_{0,95,ДМНА} = 0,01 \cdot \bar{X}_{окч,ДМНА} \cdot 3,6 \cdot \sigma_{н,ДМНА} \quad (31)$$

$$CR_{0,95,ДЭНА} = 0,01 \cdot \bar{X}_{окч,ДЭНА} \cdot 3,6 \cdot \sigma_{н,ДЭНА} \quad (32)$$

где

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

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

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

$\bar{X}_{окч,ДМНА}$, $\bar{X}_{окч,ДЭНА}$ - средние арифметические четырех результатов измерений, рассчитываемые по формулам

$$\bar{X}_{окч,ДМНА} = \frac{\sum_{i=1}^4 X_{i,ДМНА}}{4} \quad (33)$$

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

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 $CR_{абс}$

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

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

$$CR_{0,95, ДМНА} = \sqrt{r_{ГТО, ДМНА}^2 - \frac{r_{ДМНА}^2}{2}} \quad (39)$$

где

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

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

$$CR_{0,95, ДЭНА} = \sqrt{r_{ГТО, ДЭНА}^2 - \frac{r_{ДЭНА}^2}{2}} \quad (40)$$

где

$r_{ГТО, ДЭНА}$ - 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

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

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

то конечные результаты, полученные в условиях промежуточной прецизионности, считаются приемлемыми и средние значения $\bar{X}_{ДМНА}$ и $\bar{X}_{ДЭНА}$, 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:

$$\bar{X}_{обд, ДМНА} = \frac{X_{I, обд, ДМНА} + X_{II, обд, ДМНА}}{2} \quad (43)$$

где

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

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

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

$$\bar{X}_{контр, ДМНА} = \frac{X_{I, контр, ДМНА} + X_{II, контр, ДМНА}}{2} \quad (44)$$

где

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

$X_{I, контр, ДМНА}$ - содержание ДМНА в первой параллельной пробе без добавки, мг/кг;

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

$$X_{обд, изм, ДМНА} = \bar{X}_{обд, ДМНА} - \bar{X}_{контр, ДМНА} \quad (45)$$

где

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

$$Rec_{ДМНА} = \frac{X_{обд, изм, ДМНА}}{X_{обд, теор, ДМНА}} \times 100 \quad (46)$$

где

$Rec_{ДМНА}$ - степень извлечения ДМНА из образца, %.

$X_{обд, теор, ДМНА}$ - рассчитанная по процедуре приготовления величина добавки ДМНА, мг/кг, ($X_{обд, теор, ДМНА} = 0,01000$ мг/кг).

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

где

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

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

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

где

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

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

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

$$X_{\text{доб.изм.ГЭНА}} = \overline{X}_{\text{обр.ГЭНА}} - \overline{X}_{\text{контр.ГЭНА}} \quad (49)$$

где

$X_{\text{доб.изм.ГЭНА}}$ - величина добавки ДЭНА, полученная экспериментально.

$$\text{Rec}_{\text{ДЭНА}} = \frac{X_{\text{доб.изм.ГЭНА}}}{X_{\text{доб.теор.ГЭНА}}} \times 100 \quad (50)$$

где

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

$X_{\text{доб.теор.ГЭНА}}$ - рассчитанная по процедуре приготовления величина добавки ДЭНА, мг/кг, ($X_{\text{доб.теор.ГЭНА}} = 0,01505$ 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 , %

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

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

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

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. Лешоук

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)

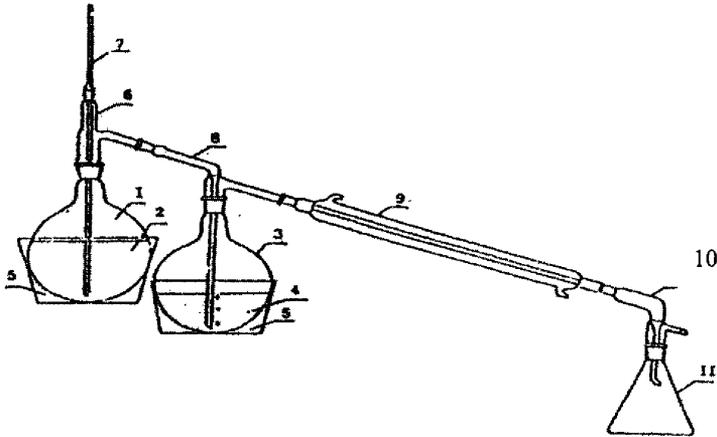


Рисунок А.1. Схема установки для перегонки с водяным паром для выделения летучих НА из пробы.

- | | |
|---------------------------------------|------------------------|
| 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; | |