

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Председателя
Госстандарт Республики Беларусь

С.А. Ивлев

«09» декабря 2008 г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный
санитарный врач Республики
Беларусь

В.И. Качан

«09» декабря 2008 г.

**ВРЕМЕННАЯ МЕТОДИКА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЛАМИНА В СУХИХ МОЛОЧНЫХ СМЕСЯХ, СУХОМ МОЛОКЕ И
ПРОДУКТАХ НА ЕГО ОСНОВЕ**

Действительно до 31.12.2008 г.

Минск 2008

СОДЕРЖАНИЕ

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

1 Область применения

Методика предназначена для определения массовой концентрации меламина в сухих молочных смесях, сухом молоке и продуктах на его основе.

Меламин (1,3,5-триазин-2,4,6-триамин) бесцветное кристаллическое вещество, температура плавления 364 °С (с разл.), плотность $D=1,571 \text{ г/см}^3$. Растворим в воде (0,5% по массе при 20 °С, 4% при 90 °С), не растворим в органических растворителях. В водных и щелочных растворах по мере увеличения температуры меламин гидролизуется последовательно до аммелина, аммелида и циануровой кислоты.

В промышленности меламин используют для получения меламино-формальдегидных и ионнообменных смол, ингибиторов коррозии и др. По токсичности меламин относится к 2-ой группе токсичности. Не допускается наличие меламина в пищевых продуктах (менее 1 мг/кг).

Диапазон измерений 1,0-100 мг/кг продукта.

Нижний предел измерения методики составляет 1,0 мг/кг

2 Показатели прецизионности методики

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

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

Диапазон измерений (мг/кг)	Показатель повторяемости, % σ_r	Показатель воспроизводимости, % σ_R
1,0 - 100	7	19

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

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

Диапазон измерений (мг/кг)	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений), % r	Предел воспроизводимости (для двух результатов анализа), % R
1,0 - 100	19	50

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Жидкостной хроматограф с диодно-матричным или УФ-спектрофотометрическим детектором		Например, фирма Agilent 1200
Центрифуга с числом оборотов не менее 4000 об/мин		Например, фирма Beckman
Ультразвуковая баня		
Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г		ГОСТ 24104-2001
Колбы мерные	2-50-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-100-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-250-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-1000-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
Пипетки градуированные	4-1-2	ГОСТ 29227-91
	5-1-2	ГОСТ 29227-91
	4-2-10	ГОСТ 29227-91
Цилиндры мерные	100 см ³	ГОСТ 1770-74
Колбы плоскодонные	100 см ³	ГОСТ 25336
Пробирки для центрифугирования вместимостью	10 – 20 см ³	ГОСТ 1770-74
Колбы грушевидные	25 см ³	ГОСТ 1770-74

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Колонка хроматографическая размером 4,6 мм × 150мм, зернение 5 мкм	Например, Eclipse XDB-C18
Мембранный фильтр Millipore с размером пор 0,45 мкм	Например, фирма Hewlett Packard
Ротационный испаритель	Например, фирма Buchi

3.3 Реактивы и материалы

Меламин, содержание основного вещества более 99,8 %	фирма «Sigma-Aldrich»
Лимонная кислота, осч	фирма «Sigma-Aldrich»

Метанол, осч	фирма «Sigma-Aldrich»
Пентасульфокислота, осч	фирма «Sigma-Aldrich»
Ацетонитрил для ВЭЖХ	фирма «Sigma-Aldrich»
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72

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

4 Метод измерения

Метод основан на экстракции меламина метанолом и определении его содержания в растворе с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

5 Требования безопасности

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

- электробезопасности (ГОСТ 12.2.003)
- пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004)
- техники безопасности при работе в химической лаборатории (ППБ 1.04)
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

6 Требования к квалификации оператора

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

7 Условия выполнения измерений

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

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$;
- температура воздуха при выполнении измерений $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление (630 – 800) мм рт. ст.;
- влажность воздуха $(65 \pm 15) \%$ при температуре 25°C ;
- напряжение питающей сети $(220 \pm 10)\text{В}$;
- частота переменного тока $(50 \pm 0,5)\text{Гц}$

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

8 Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, установление градуировочной характеристики, 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.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление стандартных растворов меламина

8.2.1.1 Приготовление основного стандартного раствора меламина концентрацией

200 мкг/см³

Навеску 0,02 г ± 0,0001 г кристаллического меламина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в 50 см³ дистиллированной воды, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. Раствор хранят в стеклянной посуде с притертой пробкой в холодильнике. Годен в течение 3 месяцев.

8.2.1.2 Приготовление градуировочных растворов меламина

Градуировочные растворы меламина концентрацией 10 мкг/см³, 5 мкг/см³, 1 мкг/см³ готовят по схеме, представленной в таблице 3. Аликвотные части основного стандартного раствора меламина переносят в мерные колбы и доводят дистиллированной водой до метки при 20±2°C.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов меламина

№ градуировочного раствора	Объем аликвотной части основного стандартного раствора меламина, см ³	Объем мерной колбы, см ³	Концентрация меламина в градуировочном растворе, мкг/см ³
1	5	100	10
2	2,5	100	5
3	1,0	100	2
4	0,5	100	1
5	0,5	200	0,5

Градуировочные растворы хранят в стеклянной посуде с притертой пробкой в холодильнике. Годны в течение 1 недели.

8.2.2 Приготовление буферного раствора

1,92 г ± 0,001 лимонной кислоты и 1,74 г ± 0,001 пентасульфокислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды (рН=3,0-3,15).

8.3 Установление градуировочной характеристики

Полученные по п. 8.2.1.2 градуировочные растворы хроматографируют, начиная с самой низкой концентрации.

Условия хроматографирования:

Состав подвижной фазы	5% ацетонитрила + 95% буферного раствора
Объем вводимой пробы	20 мкл
Скорость подачи подвижной фазы	0,6 см ³ /мин
Температура колонки	30°C
Длина волны	236 нм

Каждый градуировочный раствор хроматографируют не менее 2-х раз, принимая за результат измерения среднее арифметическое параллельных измерений.

8.4 Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика устанавливают зависимость площади пиков от соответствующей концентрации меламина в градуировочном растворе. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = aX + b$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения

$$Y = aX + b, \quad (1)$$

где

- Y - площадь пика меламина;
- X - концентрация меламина в градуировочном растворе;
- a и b - коэффициенты регрессии.

8.5 Контроль градуировочного графика

Контроль градуировочного графика осуществляют каждый раз перед началом измерений не менее, чем по двум точкам в рабочем диапазоне градуировочного графика. Расхождение между измеренной концентрацией меламина в выбранном градуировочном растворе и его фактической концентрацией, выраженной в процентах, не должна превышать норматива контроля $K_{гр} = 17\%$.

В противном случае необходимо провести построение нового градуировочного графика не менее, чем по 5 точкам.

8.6 Подготовка анализируемых образцов

Отбор проб осуществляется согласно СТБ 1036.

Навеску $1,0 \text{ г} \pm 0,01\text{г}$ пробы продукта помещают в пробирку для центрифугирования и добавляют $5,0 \text{ см}^3$ метанола. Пробирку плотно закрывают, встряхивают и помещают на 30 мин в ультразвуковую баню при комнатной температуре. Пробирку центрифугируют 5 минут со скоростью 4000-10000 об/мин. Отбирают верхний слой метанольной вытяжки в отдельную пробирку, а к оставшемуся осадку добавляют еще 5 см^3 метанола, встряхивают, помещают в ультразвуковую баню на 15 мин. и затем центрифугируют 5 минут при тех же условиях. Отбирают верхний слой метанольной вытяжки и присоединяют к первой порции, аккуратно перемешивают, отбирают 4 см^3 и упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 35°C . Добавляют к сухому остатку $0,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды, тщательно смывая стенки колбы. Полученный экстракт фильтруют через мембранный фильтр Millipore.

9 Выполнение измерений

Анализ полученного по п. 8.6 раствора проводится на жидкостном хроматографе. Условия хроматографирования такие же, как и при построении градуировочного графика п. 8.3. Определяют площади пиков, используя компьютерную систему обработки сигналов. Проводят анализ двух параллельных проб. Каждую пробу хроматографируют не менее двух раз.

10 Обработка результатов измерений

За результат определения содержания меламина в j -ой параллельной пробе ($j=2$) принимается среднее арифметическое результатов двух единичных измерений по формуле:

$$\bar{X}_j = \frac{X_{i1} + X_{i2}}{2}, \quad (2)$$

$$\text{где } X_{i1} = \frac{C_{i1} \times V_i \times V_2}{m_i}, \quad (3) \quad X_{i2} = \frac{C_{i2} \times V_i \times V_2}{m_i}, \quad (4)$$

где C_{i1}, C_{i2} - концентрация меламина в первом и втором единичном измерениях параллельной пробы, рассчитанная по градуировочному графику, мкг/см^3 ;

m_i – масса навески в параллельной пробе, г;

V_i – объем метанола для экстракции меламина из навески пробы, см^3 ;

V_2 – объем воды для разбавления сухого остатка в параллельной пробе, см^3 ;

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение определения содержания меламина в двух параллельных пробах:

$$\bar{X} = \frac{\bar{X}_{j1} + \bar{X}_{j2}}{2}, \quad (5)$$

Окончательный результат округляют до второго знака после запятой.

Если величина X_j оказывается меньше предела измерения методики (C_{LOQ}), то вычисления по п.10 не производятся, а дается односторонняя оценка массовой концентрации меламина в пробе, в виде $X_j < (C_{LOQ})$, где (C_{LOQ}) – нижний предел измерения методики (C_{LOQ})= 1,0 мг/кг.

11 Оформление результатов испытаний

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

Результаты должны включать следующую информацию:

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

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

$$(\bar{X} \pm U(X)), \text{ мг/кг} \quad (5)$$

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

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

$$U(X)_{\text{абс}} = U(X)_{\text{отн}} \times 0,01 \times \bar{X} \quad (6)$$

12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

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

Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводится на основании расчета расхождения r между содержанием пантотеновой кислоты в параллельных измерениях. Расхождение рассчитывается по формуле:

$$r = \frac{|\bar{X}_{j1} - \bar{X}_{j2}|}{\bar{X}} \times 100 \quad (7)$$

Допустимые расхождения между параллельными измерениями по отношению к величине среднего арифметического значения не должны превышать 5%.

Если абсолютное значение разности r_K между двумя результатами испытаний не превышает предел повторяемости r (таблица 2), то оба результата считаются приемлемыми, и конечный заявляемый результат является их средним арифметическим.

r_K рассчитывается по формуле:

$$r_K = \frac{(C_{\max} - C_{\min}) \times 100}{C_{\text{cp}}}$$

(8)

- r_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.

$$r_K \leq r,$$

Если же абсолютное значение разности r_K превышает значение r , контроль повторяют. При повторном превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля воспроизводимости.

13 Проверка стабильности результатов испытаний

Стабильность результатов измерений может быть проверена с использованием контрольной карты Шухарта в соответствии с СТБ ИСО 5725-6 п.6.2.2, МИ 2335 п.6.

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

Рассчитывают:

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

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

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

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

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

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

σ_r – стандартное отклонение повторяемости, мг/100 г.

Оценку стандартного отклонения повторяемости s_r получают по формуле:

$$s_r = \left(\frac{\sum w_i}{L} \right) = \bar{w} / d_2 \tag{9}$$

где $w = |x_1 - x_2|$ - размах;

x_1 и x_2 – результаты первого и второго определения, мг/100г;

L – количество проведенных измерений.

Полученные значения заносят в лист данных контрольной карты:

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

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

Если размах w выходит за линии предупреждающей и регулирующей границ, то результаты признаются нестабильными. В этом случае выясняются причины нестабильности и проводятся мероприятия по их устранению

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

Разработчики:

Зав. лабораторией ХПП ГУ «РНПЦ гигиены», к.х.н.

Ст.н.с. лаборатории ХПП ГУ «РНПЦ гигиены»

Зав. лабораторией СХТМИ РЦГЭ и ОЗ

Инженер лаборатории СХТМИ РЦГЭ и ОЗ

Ведущий инженер ОДО Селентехнология

О.В. Шуляковская

Л.Л. Бельшева

Лебедева А.М.

Шестакович И.О.

Зубкевич Л.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(обязательное)

Нормативные ссылки

ГОСТ 15150-69	Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды.
ППБ 1.04 – 2002	Инструкции «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях». – М.: Химия, 1979 г. ; Общие правила пожарной безопасности Республики Беларусь для общественных зданий и сооружений.»
ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.
ГОСТ 12.2.003-91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
ГОСТ ИСО 5725-6 -2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике (ISO 5725-6:1994/Соч.1:2001,ИДТ)
МИ 2335 -2003	Рекомендации «Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа» - Екатеринбург, 2003 г.