.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
Главный государственный врач
Республики Беларусь

М.И. Римжа
«05» января 2007 г.
Регистрационный номер № 107-1006

МЕТОДИКА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРОЗАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ

Минск 2007

1.Область применения

Настоящий документ «Методика определения нитрозаминов в продуктах питания и продовольственном сырье» устанавливает методику выполнения измерений массовой концентрации (далее - концентрация) суммы летучих нитрозаминов (далее - НА) – диметилнитрозамин (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, овощах и фруктах) 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}) 1,005, температура кипения 152- 153°C, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. Структурная формула - $(CH_3)_2N$ - N=0, молекулярная масса – 74,08.

Диэтилнитрозамин – маслянистая жидкость, d^{20} 0,9422, температура кипения – 176,9^{O}C, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. Структурная формула - $(C_2H_5)_2N$ - N=0, молекулярная масса – 102,13.

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

В соответствии с Санитарными правилами и нормами «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов» № 11-63-РБ-98, утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 2 июля 1998 г. № 22, 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 – не более 0,003 мг/кг, в продуктах для детского питания – не допускается при чувствительности метода не более 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, синтезе производных полученных аминов с 5-(диметиламино)-нафталин-1-сульфохлоридом (далее - дансилхлоридом), хромотографическом разделении и количественном определении образовавшихся производных на жидкостном хроматографе с флуориметрическим детектором.

Диапазон измерений для ДМНА – 0,025 – 1,00 мкг/100г (0,00025 – 0,001 мг/кг) и для ДЭНА – 0,075 – 1,50 мкг/100г (0,00075 – 0,015 мг/кг), при навеске анализируемой твердой и сыпучей пробы 100 г.

Чувствительность жидкостного хроматографа с флуориметрическим детектором в анализируемом объеме – 0,5 нг – для ДМНА, 1,5 нг – для ДЭНА. Нижний предел предлагаемых концентраций соответствует в сумме (ДМНА + ДЭНА) ½ ПДК гигиенического норматива – 0,001 мг/кг.

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 методом для надежного результата. [2]

2.Показатели прецизионности методики

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

Таблица 1. Относительные значения показателей повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р=0,95 МВИ

Диапазон измерений суммы НА (мг/кг)	Показатель повторяемости, % σ_r	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости, % σ_R
0,001 – 0,040	3,1	6,0

Относительные значения пределов повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р=0,95 указаны в таблице 2.

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

Диапазон измерений суммы НА (мг/кг)	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений), % r	Предел внутрилабораторной воспроизводимости (для двух результатов анализа), % R
0,001 – 0,040	8,7	16,8

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

Средства измерений

Хроматограф жидкостной с флуоресцентным детектором, и хроматографической колонкой металлической (250х4,6мм)	
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104-80 Е
Весы лабораторные общего назначения	ГОСТ 19491-74
Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2, цена деления 1^{O}С, пределы измерения 0-55 ^{O}С	ГОСТ 21 5-73 Е
Микрошприц для хроматографа, «Hamilton» 50мкл, цена деления 1 мкл	фирма «Sigma-Aldrich», производитель USA
Микрошприц 250мкл, цена деления 2,5 мкл	
Микрошприц 500мкл, цена деления 5,0 мкл	
Пипетки 1-1-1-0,1	ГОСТ 29227-91
1-1-1-1	
1-1-1-2	
Колба мерная 2-10 (25,100,250,500)-2	ГОСТ 1770-74
Цилиндр мерный на 50, 100, 250 мл	ГОСТ 1770-74
Пробирка мерная на 5, 10 мл	

Вспомогательные устройства и оборудование

Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М	ТУ 25-11-917-74
Воронки ВД-1-500	ГОСТ 25336-82
Воронки конические, стеклянные диаметром 30-33 мм	ГОСТ 25336-82
Колба $К_н$-1-100(250) – 14/23 (29/32) ТС	ГОСТ 25336-82
Колба $К_г$-50-14/23 ТС	ГОСТ 25336-82
Колба К-1-100(250) – 29/32 ТС	ГОСТ 25336-82
Мясорубка и измельчитель	
Фарфоровые чашки для выпаривания	

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

Реактивы и материалы

Неподвижная фаза Hypersil ODS, 5мкм	фирма «Agilent»
Стандартный образец (далее - СО) ДМНА в метаноле 200 мкг/см^3	фирма «Supelko», каталожный № 48670
СО ДЭНА в метаноле 5000 мкг/см^3	фирма «Supelko», каталожный № 40334
СО дипропилнитрозамин (далее - ДПНА) в метаноле 100 мкг/см^3	фирма «Supelko», каталожный № 40061
Метанол 99,9%	фирма «Merck»
Ацетон ос.ч.	фирма «Merck»
Ацетонитрил для ВЭЖХ или сорт 1-3 «Криохром»	ГОСТ 61-75
Кислота бромистоводородная, х.ч.	ТУ 6-09-3534-74
Кислота уксусная, х.ч.	ТУ 6-09-1649-87
Хлористый метилен, о.с.ч.	фирма «Merck»
Натрий сернокислый безводный, х.ч.	ГОСТ 4166-76
Дансилхлорид, 95%	фирма «Sigma», каталожный № D2625-1г
Кислота серная, х.ч.	ГОСТ 4204-77
Натрия гидроокись, х.ч.	ГОСТ 4201-79
Натрий углекислый кислый, х.ч.	ГОСТ 4201-79
Сульфаминовая или сульфаниловая кислота	ГОСТ 5821-78
Бензол, х.ч.	ГОСТ 5955-68
Натрий хлористый, х.ч.	ГОСТ 4233-77
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-77
Фильтры бумажные, «синяя лента»	ТУ-6-09-1678-86

Могут быть использованы реактивы и материалы по техническим характеристикам отличающиеся от указанных, но не влияющие на результаты измерения методики.

4. Метод измерения

Метод измерения основан на измерении результатов исследования жидкостной хроматографией с флуориметрическим детектором образцов на содержание суммы НА после следующих этапов подготовки:

- 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 в подвижной фазе на ВЭЖХ.

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 необходимо всегда иметь 2-4% раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте для разрушения НА при попадании их на рабочие места и пол. В целях разрушения летучих НА в воздухе по окончании работы 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, которую также оплавляют парафином.

НА хранят в специальном холодильнике в отсутствие анализируемых проб.

6. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие требования безопасности и настоящую методику, имеющие опыт работы с ядовитыми веществами и навыки в методах экстракции, концентрирования и получения различных производных.

7. Условия выполнения измерений

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

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных (20±2) ^{O}С;
- температура воздуха (20±5) ^{O}С;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм ртутного столба);
- влажность воздуха (65±15)% при температуре 25 ^{O}С;
- напряжение питающей сети (220±10)В;
- частота переменного тока (50±0,5)Гц, что соответствует ГОСТ 15150-69.

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

Включить жидкостной хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Установить рабочие режимы для колонки и детектора. Дегазировать подвижную фазу, промыть колонку до стабильности работы прибора, контролируя по дрейфу базовой линии при чувствительности, соответствующей минимальной концентрации определения.

8.2. Приготовление растворов

8.2.1. Раствор дансилхлорида с концентрацией 1 мг/см^3.

Навеску дансилхлорида массой 25 мг помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3 и растворяют в 25 см^3 ацетона. Готовый раствор хранят в холодильнике, тщательно предохраняя от попадания влаги. Срок хранения – не более 3 месяцев.

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

В коническую колбу вместительностью 100 см^3 вносят 5 см^3 30%-ной бромистоводородной кислоты и добавляют 45 см^3 ледяной уксусной кислоты. Смесь хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Срок хранения – не более 1 месяца. Признаком непригодности смеси является появление желто-коричневой окраски.

8.2.3. Буферный раствор с pH – 10,5.

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

8.2.4. Раствор серной кислоты с концентрацией 1н.

В мерную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 200 см^3 дистиллированной воды. Добавляют 6,7 см^3 концентрированной серной кислоты. Доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают. Срок хранения не ограничен.

8.2.5. Рабочий раствор ДМНА с концентрацией 10 мкг/см^3.

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 стандартного образца состава ДМНА с концентрацией 200 мкг/ см^3 и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

8.2.6. Рабочий раствор ДЭНА с концентрацией 10 мкг/ см^3.

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 20 мкл стандартного образца состава ДЭНА с концентрацией 5000 мкг/ см^3 и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают. Смесь хранится в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

8.2.7. Рабочий раствор ДПНА с концентрацией 10 мкг/ см^3.

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 1,0 см^3 стандартного образца состава ДПНА с концентрацией 100,0 мкг/ см^3 и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

8.2.8. Подвижная фаза для жидкостного хроматографа – смесь ацетонитрил : вода (1:1).

В коническую колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 500 см^3 ацетонитрила. Добавляют 500 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают и дегазируют. Срок хранения не ограничен.

8.2.9. Хлористый метилен.

Очистку хлористого метилена производят перегонкой с дефлегматором. При этом отбирают не более 80% растворителя от начального объема.

8.2.10.Приготовление градуировочных растворов

8.2.10.1. Приготовление основной смеси ДМНА, ДЭНА и ДПНА с концентрациями компонентов 1,0, 3,0 и 5,2 мкг/ см^3 соответственно.

В колбе вместимостью 10 см^3 с притертой пробкой смешивают 1 см^3 раствора ДМНА (10 мкг/ см^3), 3 см^3 ДЭНА (10 мкг/ см^3) и 5,2 см^3 ДПНА (10 мкг/ см^3). Смесь хранится в посуде из темного стекла, со специальной пробкой-затвор, в холодильнике (при температуре +4 ^{O}С) не более 6 месяцев.

8.2.10.2. Проведение реакции денитрозирования – получение аминов.

В 8 колб на 100 мл для упаривания вливают по 60 см^3 хлористого метилена в каждую колбу вносят смесь НА, приготовленную по п. 8.2 настоящей методики, согласно таблице 3.

Таблица 3. Схема подготовки серий разведений смеси НА с расчетом содержания каждого НА и суммы ДМНА и ДЭНА

№ градуировочного раствора	Объем основной смеси НА, приготовленной в соответствии с п. 8.2.10.1, мкл	Содержание НА, мкг			
		ДМНА	ДЭНА	ДПНА	Сумма НА, ДМНА+ДЭНА мкг/мл
1	25	0,025	0,075	0,130	0,100
2	50	0,050	0,150	0,260	0,200
3	75	0,075	0,225	0,390	0,300
4	100	0,100	0,300	0,520	0,400
5	250	0,250	0,750	1,300	1,000
6	500	0,500	1,500	2,600	2,000
7	750	0,750	2,250	3,900	3,000
8	1000	1,000	3,000	5,200	4,000

Содержимое в колбах хорошо перемешивают и добавляют в каждую по 2 см^3 3%-ного раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте. Колбы выдерживают 30 мин при комнатной температуре, затем упаривают хлористый метилен до 2 мл на ротационном испарителе при 30°С. 2 мл раствора в уксусной кислоте из колб переносят в фарфоровые чашки и осторожно выпаривают его на песчаной бане не выше 120°С до влажного остатка, который полностью будет сухим при снятии с бани в вытяжном шкафу при охлаждении (в результате перепада температуры).

8.2.10.3. Получение дансилпроизводных аминов.

К сухому охлажденному остатку в фарфоровых чашках добавляют по 0,6 мл буферного раствора с pH=10,5, тщательно круговыми движениями растворяют сухой остаток. Добавляют по 0,3 мл раствора дансилхлорида в ацетоне концентрацией 1 мг/мл, перемешивают и полученный экстракт переносят в пробирки с притертыми пробками для процесса дансилирования, который проходит 40 мин при температуре 55°С на водяной бане. После образования дансилпроизводных, из водно-ацетонового экстракта производят переэкстракцию дансилпроизводных аминов в 1 мл бензола встряхиванием в течение 5 мин. После расслаивания, прозрачные бензольные экстракты отбирают по 0,5 мл и переносят в 8 сухих пробирок с пришлифованными пробками. Бензол выдувают потоком воздуха досуха, строго в вытяжном шкафу, а остаток растворяют в 0,5 мл подвижной фазы. 20 мкл исследуемого раствора из каждой пробирки анализируют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, записывая хроматограммы не менее 2-х раз.

8.2.10.4. Приготовление «холостой» пробы.

Приготовление «холостой» пробы или контроль на реактивы проводится с целью определения наличия НА в применяемых реактивах и их вычитание из результатов анализа.

В колбу для перегонки помещают все используемые реактивы в 250 мл дистиллированной воды, добавляют 0,26 мл раствора ДПНА (10 мкг/мл) и далее как в п. 9.1. – 9.2.

8.3. Установление градуировочной характеристики

Хроматографирование градуровочных растворов и «холостой» пробы проводится при следующих условиях:

- жидкостной хроматограф с флуоресцентным детектором;
- колонка из нержавеющей стали (250х4 мм), заполненная сорбентом Hypersil ODS C_{18}, зернением 5 мкм;
- температура колонки 30 ^{O}C;
- подвижная фаза – смесь ацетоннитрил-вода в объемном соответствии 1:1, скорость элюирования – 1 мл/мин;
- длина волны возбуждения – 350 нм;
- эмиссионный фильтр – 530 нм;
- объем вводимой пробы – 20 мкл;
- время удерживания дансилпроизводных: МА – 6-7 мин, ЭА – 7,5-8,5 мин, ПА -9-10 мин, конкретно устанавливается по калибровочным смесях при подобранных условиях хроматографии.

8.4. Градуировка хроматографа

В результате использования способа количественной оценки содержания нитрозаминов методом внутреннего стандарта, необходимо предварительно провести градуировку хроматографа, используя градуировочные растворы приготовленные по п. 8.2.10.

При условиях хроматографии, указанных в п. 8.3, записывают по три хроматограммы для каждого из приготовленных растворов и измеряют площади пиков дансилпроизводных МА, ЭА и ПА. Определяют среднеарифметическое значение площадей пиков, рассчитанное из площадей трех хроматограмм. Имея данные площадей пиков и их концентрацию, рассчитывают градуировочные коэффициенты (К) для ДМНА и ДЭНА по следующей формуле:

$$K_{ДМНА(ДЭНА)} = \frac{m_{ДМНА(ДЭНА)} \times S_{вн.ст.}}{m_{вн.ст.} \times S_{ДМНА(ДЭНА)}},$$

где $m_{ДМНА(ДЭНА)}$ – масса введенных в хроматограф ДМНА и ДЭНА, мкг;

$S_{ДМНА(ДЭНА)}$ – площади полученных пиков ДМНА и ДЭНА, см^2;

$S_{вн.ст.}$ – площадь внутреннего стандарта – ДПНА, см^2;

$m_{вн.ст.}$ – масса введенного внутреннего стандарта – ДПНА, мкг;

Градуировочный коэффициент К рассчитывается для каждого раствора. Его значения не должны отличаться от среднеарифметического значения градуировочного коэффициента из всех результатов более чем на 10%, рассчитывается по следующей формуле:

$$A = \frac{(K_i - \overline{K}_i)}{\overline{K}_i} \times 100 \leq 10\%,$$

где: А – стабильность градуировочных коэффициентов;

K_i – градуировочный коэффициент для i-той концентрации;

$\overline{K}_i$ – среднее значение для всех исследуемых концентраций.

8.5. Контроль градуировочных характеристик

Контроль градуировочных характеристик осуществляется по внутреннему стандарту, вводимому в контрольный и исследуемый образец. Повторное установление градуировочных характеристик производится лишь в том случае, если используется другая партия реактивов, приборов и других вспомогательных материалов.

8.6. Подготовка анализируемых образцов

Отбирают не менее 1 кг средней пробы пищевого продукта или продовольственного сырья в соответствии с требованиями СТБ 1036-97 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности».

Отобранные образцы можно хранить в морозильной камере при -8 – -18 ^{O}С 1-3 суток в зависимости от сроков реализации продукции.

9. Проведение анализа

Выделение НА путем отгонки с водяным паром

Навеску 100 г измельченного в мясорубке или измельчителе пищевого продукта (напитков 250 см^3 или детского питания) помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см^3, соединенную с паровиком и прямым холодильником в соответствии с рисунком приложения 2 настоящей методики. К продукту добавляют 100-150 мл дистиллированной воды (в зависимости от влажности продукта), 0,26 мл раствора НДПА с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и перемешивают. В смесь добавляют 10 г хлорида натрия, 10 г сульфата натрия или магния, 1 г сульфаниловой кислоты, 10 мл 1 н раствора серной кислоты. Все перемешивают, подсоединяют колбу к системе и отгоняют НА с водяным паром, собирая 200-250 мл дистиллята.

Экстракция НА из дистиллята

200-250 мл дистиллята экстрагируют в делительной воронке хлористым метиленом три раза порциями по 20 мл в течение 5 мин. Каждую порцию экстракта сливают через воронку с бумажным фильтром, заполненную 5 г безводного сульфата натрия. Фильтр с безводным сульфатом Na промывают 10 мл экстрагента. Далее анализ проводится аналогично п. 8.2.10.2 и 8.2.10.3.

Полученные дансилпроизводные анализируют на жидкостном хроматографе, записывая хроматограммы не менее 2-х раз.

10. Результаты анализа

Для расчета конечного содержания суммы НА в исследуемом образце замеряют площади пиков дансилпроизводных МА, ЭА и ПА в исследуемом образце и в контрольном образце и рассчитывают содержание (Х мг/кг) суммы НА по формулам:

$$m_{ДМНА} = \frac{m_{вн.ст.} \times (S_{обр.ДМНА} - S_{контр.ДМНА}) \times K_{ДМНА}}{S_{вн.ст.}} (мкг)$$

$$m_{ДЭНА} = \frac{m_{вн.ст.} \times (S_{обр.ДЭНА} - S_{контр.ДЭНА}) \times K_{ДЭНА}}{S_{вн.ст.}} (мкг)$$

$$X_{ДМНА+ДЭНА} = \frac{m_{ДМНА} + m_{ДЭНА}}{P} (мг/кг)$$

где: $m_{ДМНА}$; $m_{ДЭНА}$ - содержание ДМНА и ДЭНА в исследуемом образце, мкг;

$S_{обр.ДМНА}$; $S_{обр.\ ДЭНА}$ - площади пиков ДМНА и ДЭНА в исследуемом образце, см^2;

$S_{контр.\ ДМНА}$; $S_{контр.\ ДЭНА}$ - площади пиков ДМНА и ДЭНА в контрольном («холостом») образце, см^2;

$m_{вн.ст.}$ – масса ДПНА, введенного в образец и контроль, мкг;

$K_{ДМНА,\ ДЭНА}$ - калибровочный коэффициент для ДМНА и ДЭНА;

P - навеска, г.

В случае получения результатов анализа с содержанием ДПНА (внутреннего стандарта) выше регламентируемой величины, необходимо провести анализ образца без внесения внутреннего стандарта и рассчитать содержание ДПНА, ориентируясь на площади пиков ДМНА и ДЭНА в пробе анализируемой ранее.

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

$(\overline{X} \pm U(X))$, мг/кг

где $\overline{X}$ - результат измерений, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно п. 10, по результатам не менее 2-х параллельных исследований одного образца;

U(X) - расширенная неопределенность результата измерений $\overline{X}$, мг/кг.

Расширенную неопределенность рассчитывают по формуле

$U = k \times u_c(X)$,

где К – коэффициент охвата, равный 2 при доверительной вероятности Р=0,95;

$u_c(X)$ – суммарная стандартная неопределенность результата измерений $\overline{X}$, мг/кг.

12. Проверка приемлемости результатов испытаний

Проверку приемлемости результатов осуществляют согласно п. 5.2.2.1 СТБ ИСО 5725-6-2002. Два результата испытаний должны быть получены в условиях повторяемости.

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

- 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.

$r_K \le r$,

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 метода добавок и разведений или с использованием контрольной карты Шухарта в соответствии с СТБ ИСО 5726-6-2002.

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

Рассчитывают:

- центральную линию: $d_2 \times s_r$,

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

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

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

- предупреждающие границы: UCL=D2(2)$\times s_r$,

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

s_r - стандартное отклонение повторяемости, мг/кг.

Оценку стандартного отклонения повторяемости s_r получают по формуле:

$$s_r = \left(\frac{\sum w_i}{L} \right) = \overline{w} / d_2 .$$

где $w = |x_1 - x_2|$. - размах;

x_1 и x_2 - результаты первого и второго определения, мг/кг;

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	$\overline{w}/d_2$

Графически по оси X откладываю дату проведения анализа, по оси У - размах w. Также отмечают 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.