

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Председателя
Государственного комитета
по стандартизации
Республики Беларусь
_____ С.А. Ивлев

«___» _____ 2009 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь
_____ В.И. Качан

«___» _____ 2009 г.

**ВРЕМЕННАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
ХОЛИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ**

Минск 2009

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	8
12	Проверка приемлемости результатов, полученных испытаний в условиях повторяемости	9
13	Проверка стабильности результатов испытаний	10

1 Область применения

Методика предназначена для определения содержания холина:

- в небогатых продуктах питания;
- обогащенных витаминными премиксами продуктах питания;
- биологически активных добавках к пище.

Холин (2-гидроксиэтил-триметиламмоний гидроксид) $[(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]\text{OH}$. М.в. 121,2. Представляет собой вязкую сиропообразную жидкость растворимую в воде, этиловом спирте, мало растворима в амиловом спирте, нерастворима в эфире. Имеет сильно щелочную реакцию. Свободный холин гигроскопичен. В растворах холин устойчив к нагреванию. Холин образует соли со многими органическими и неорганическими кислотами. Наиболее распространена его хлористоводородная соль. Холинхлорид $[(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]\text{Cl}$. М.в. 139,6. Представляет собой бесцветные кристаллы хорошо растворимые в воде, этиловом спирте. Холинхлорид менее гигроскопичен, чем свободный холин.

Значение холина для процессов жизнедеятельности определяется его участием в трех биохимических процессах: синтезе фосфатидов и липопротеидов, образовании нейрогоморального медиатора ацетилхолина и использовании как донора метильных групп в реакциях переметилирования.

Метод основан на кислотном гидролизе образца, образовании комплекса рейниката холина и его спектрометрическом определении. Оптическая плотность раствора комплекса прямо пропорциональна количеству холина.

Диапазон определяемых концентраций составляет 25-20000 мг/100 г.

Нижний предел измерения методики составляет 25 мг/100 г.

Диапазон определяемых концентраций в спектрофотометрируемом объеме 0,1 – 2 мг/см³.

2 Показатели прецизионности методики

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

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости, внутрилабораторной воспроизводимости и расширенной относительной стандартной неопределенности МВИ при доверительной вероятности $P=0,95$

Диапазон измерений (мг/100 г)	Показатель повторяемости, % σ_r	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости, % σ_R	Расширенная относительная стандартная неопределенность U, %
25 – 100 вкл.	5,0	7,0	7
св. 100 – 1000 вкл.	2,5	4,0	4
св. 1000 – 20000 вкл.	0,4	1,5	1

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

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

Диапазон измерений (мг/100 г)	Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений),% г	Предел внутрилабораторной воспроизводимости (для двух результатов анализа),% R
25 – 100 вкл.	14	20
св. 100 – 1000 вкл.	7	11
св. 1000 – 20000 вкл.	1	4

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Спектрофотометр Cary 50, обеспечивающий измерения в диапазоне длин волн 200-800 нм;
Пределы измерений (0,0 ÷ 2,0) Б;
Класс точности (погрешность) $\pm 0,015$ Б

Фирма «Varian», Австралия

Весы лабораторные АС-210Р, (диапазон взвешивания 0,0100- 210,0000 г, погрешность взвешивания 0,2 мг)

ГОСТ 24104-2001

Баня водяная с обогревом, позволяющая поддерживать температуру от 0 до 100°C с погрешностью $\pm 2^\circ\text{C}$.

Холодильник компрессионный

Колбы мерные	2-10-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-100-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-200-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
Колбы конические	2-100-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
	2-250-2	ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80)
Пипетки градуированные	1-1-2-1	ГОСТ 29227-91
	1-1-2-5	ГОСТ 29227-91
	1-2-2-10	ГОСТ 29227-91
Цилиндры мерные	50 см ³	ГОСТ 1770-74
	100 см ³	ГОСТ 1770-74
Стаканы химические	200 см ³	ГОСТ 1770-74

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Плитка электрическая	ГОСТ 14919-83
Часы класса 2	ГОСТ 3145-84
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336

3.3 Реактивы и материалы

Холинхлорид	Фирма Fluka, сод. осн. в-ва 99%, кат № 26978
Рейникат аммония	Фирма Sigma, кат № 183687
Кислота азотная, осч	ГОСТ 11125-83
Натрия гидроокись, чда	ГОСТ 4328-77
Спирт этиловый	ГОСТ 18300-87
Ацетон, чда	ГОСТ 2603-71
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Фильтр «синяя лента»	ГОСТ 12026-76
Универсальные индикаторные бумаги	ПНД 50-975-84

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

4 Метод измерения

Сущность метода заключается в освобождении связанных форм холина путем кислотного гидролиза, образовании комплекса холина с рейникатом аммония и последующем анализе его ацетоновых растворов спектрофотометрическим методом.

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 и обработке их результатов допускают специалистов, имеющих высшее или среднее специальное образование, прошедших соответствующий инструктаж, освоивших метод в процессе стажировки.

7 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха 20 – 25°C;
- атмосферное давление 84,0 – 106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25°C;
- напряжение питающей сети 220 ± 10 В;
- частота переменного тока 50 ± 1Гц

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 спектрофотометр согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочий режим измерения длины волны 526 нм.

8.2 Приготовление растворов

8.2.1 Приготовление водного раствора 20% HNO₃

30 см³ концентрированной HNO₃ плотностью 1,513 г/см³ растворяют в 100 см³ дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 200 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. Полученный раствор хранят в склянке с притертой пробкой при комнатной температуре. Годен в течение 3 месяцев.

8.2.2 Приготовление водного раствора 33 % NaOH

К 33 г NaOH добавляют 67 см³ дистиллированной воды, осторожно перемешивают и охлаждают до комнатной температуры. Полученный раствор хранят в склянке с притертой пробкой при комнатной температуре. Годен в течение 3 месяцев.

8.2.3 Приготовление спиртового раствора 2 % рейниката аммония

2 г рейниката аммония растворяют в 122 см³ этилового спирта (ρ=0,8014) в конической колбе при нагревании на водяной бане при температуре 40±2 °С в течение 20 мин. После охлаждения раствор фильтруют через обеззоленый складчатый фильтр. Раствор готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежит.

8.2.4 Приготовление стандартного раствора холинхлорида концентрацией 1 мг/см³

Взвешивают 0,1 г холинхлорида с точностью ±0,0015 г и растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³. Раствор готовят непосредственно перед применением. Хранению не подлежит.

8.3. Построение градуировочного графика

8.3.1 Проведение кислотного гидролиза градуировочных растворов

В 5 конических колб вместимостью 100 см³ помещают 1, 2, 5, 7, 10 см³ стандартного раствора холинхлорида (п. 8.2.4), добавляют по 25 см³ 20% раствора азотной кислоты и выдерживают в кипящей водяной бане с обратным холодильником 2 часа. Затем гидролизаты подщелачивают 33 % раствором гидроокиси натрия до рН 10 (рН контролируют индикаторной бумажкой). Содержимое колб охлаждают до 20 °С.

8.3.2 Осаждение комплекса рейниката холина

К содержимому колб добавляют 15 см³ 2 % раствора рейниката аммония и оставляют на 18 ч в холодильнике (при температуре 4±2 °С). Выпавший осадок комплекса рейниката холина отфильтровывают через обеззоленный складчатый фильтр. Далее осадок на фильтре промывают 5 см³ этилового спирта, предварительно охлажденного до 0 °С. Промывание осадка повторяют 4 – 5 раз. Затем осадок на фильтре растворяют ацетоном, промывая фильтр небольшим его количеством (6 – 8 см³), и доводят объем до метки в мерной колбе вместимостью 10 см³.

8.3.3 Установление градуировочной характеристики

Полученные по п. 8.3.2 растворы помещаются в кювету толщиной поглощающего свет слоя 10 мм. Оптическую плотность градуировочных растворов измеряют на спектрофотометре при длине волны 526 нм относительно ацетона.

Каждый градуировочный раствор спектрофотометрируют по два раза, начиная с самой низкой концентрации, принимая за результат измерения среднее арифметическое двух параллельных измерений.

8.3.4 Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика измеряют оптическую плотность соответствующей концентрации холина в градуировочных растворах. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = a + bX$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учетом вычисленных значений уравнения

$$Y = a + bX, \quad (1)$$

где

Y – измеренная оптическая плотность;

a и b – коэффициенты регрессии;

X – концентрация холинхлорида в градуировочном растворе.

8.3.5 Контроль градуировочного графика

Контроль градуировочного графика осуществляется каждый раз перед началом измерений не менее чем по двум точкам в рабочем диапазоне измерений.

8.4 Подготовка анализируемых образцов

Среднюю пробу анализируемого продукта (400 – 500 г) термостатируют при температуре 20 ± 2 °С в течение 30 минут. Твердые образцы предварительно измельчают с помощью ножа, терки, ступки и т.п., гомогенизируют в блендере, тщательно перемешивают.

8.4.1 Проведение кислотного гидролиза

Навеску образца 1 – 10 г, взвешивают с точностью $\pm 0,01$ г, помещают в коническую колбу вместимостью 100 см³, добавляют 25 см³ 20 % раствора азотной кислоты и выдерживают в кипящей водяной бане с обратным холодильником 2 часа. Затем горячий гидролизат фильтруют и осадок на фильтре промывают 20 % раствором азотной кислоты. Фильтрат подщелачивают 33 % раствором гидроксида натрия до рН 10 (рН контролируют индикаторной бумажкой). Содержимое колбы охлаждают до 20 °С.

8.4.2 Осаждение комплекса рейниката холина

Осаждение комплекса рейниката холина проводится по п. 7.3.2.

9 Выполнение измерений

Анализ полученных растворов по п. 7.4.2 проводится на спектрофотометре. Условия такие же, как и при построении градуировочного графика (п. 7.3.3). Измеряют величину оптической плотности при длине волны 526 нм относительно ацетона. Проводят анализ двух параллельных проб. Каждую пробу спектрофотометрируют не менее двух раз.

10 Обработка результатов измерений

Расчет концентрации холина (X) в мг/100 г проводится по формуле:

$$X = \frac{C \times V \times 100}{m}, \quad (2)$$

где

C – концентрация холина, найденная по градуировочному графику, мг/см³;

V – объем раствора комплекса рейниката холина, см³;

m – масса навески, г;

100 – расчет на 100 г.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных измерений. Вычисления проводят до второго десятичного знака и округляют до первого.

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.

Если величина X оказывается меньше предела измерения методики (C_{LOQ}), то вычисления по п.10 не производятся, а дается односторонняя оценка массовой концентрации холина в пробе в виде $X < (C_{LOQ})$, где (C_{LOQ}) – нижний предел измерения методики (C_{LOQ})= 25 мг/100 г.

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

$$(\bar{X} \pm U(X)), \text{ мг/100 г} \quad (3)$$

где

\bar{X} – среднее арифметическое из 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/100 г. Рассчитывается по формуле:

$$U(X) = U \times 0,01 \times \bar{X} \quad (\text{таблица 1}) \quad (4)$$

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.

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами единичных наблюдений $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости $r_{абс}$. Абсолютное значение предела повторяемости $r_{абс}$, мг/100 г, рассчитывают по формуле

$$r_{абс} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (5)$$

где

0,01 – коэффициент для пересчета процентов;

\bar{X} – среднее арифметическое значение двух результатов единичных наблюдений, мг/100 г;

r – относительное значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 2.

Если для значения абсолютного расхождения между двумя результатами единичных наблюдений выполняется условие

$$|X_1 - X_2| < r_{абс} \quad (6)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение \bar{X} , рассчитанное по формуле (2).

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Рассчитывают среднее арифметическое значение \bar{X} , мг/100 г, результатов измерений \bar{X}_1 и \bar{X}_2 соответственно, полученные в условиях внутрилабораторной воспроизводимости при выполнении условий повторяемости по п.12.

$$\bar{X} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} . \quad (7)$$

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела внутрилабораторной воспроизводимости R_{abc} . Абсолютное значение предела внутрилабораторной воспроизводимости R_{abc} , мг/100 г, рассчитывают по формуле

$$R_{abc} = 0,01 \cdot R \cdot \bar{X} , \quad (8)$$

где

0,01 – коэффициент для пересчета процентов;

\bar{X} – среднее арифметическое значение результатов измерений \bar{X}_1 и \bar{X}_2 , мг/100 г;

R – относительное значение предела воспроизводимости, указанное в таблице 2.

Если для значения абсолютного расхождения между результатами выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| < R_{abc} . \quad (9)$$

то оба конечных результата, полученные в условиях внутрилабораторной воспроизводимости, считаются приемлемыми и общее среднее значение \bar{X} , рассчитанное по формуле (7), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

При 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 холина 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:

$$s_r = \left(\frac{\sum w_i}{L} \right) = \bar{w}/d_2, \quad (10)$$

где

$w = |X_1 - X_2|$ – размах;

X_1 и X_2 – результаты первого и второго определения, мг/100г;

L – количество проведенных измерений, равное 4.

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, к.х.н.

Ст.н.с. лаборатории ХПП

Мл.н.с. лаборатории ХПП

О.В. Шуляковская

Л.Л. Бельшева

Т.А. Гуринович