

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 L-КАРНИТИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ И БАД

Срок действия методики с 01.06.2009 г по 01.06.2011 г

Минск 2009

СОДЕРЖАНИЕ

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

1 Область применения

Методика предназначена для определения содержания L-карнитина в продуктах питания и БАД.

L-карнитин (γ -триметил- β -гидроксипутиробетанин) гигроскопическое кристаллическое вещество. Хорошо растворим в воде и этаноле. Мало растворим в ацетоне, изопропанол, не растворим в эфире.

Диапазон измерений 1,0-10,0 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 – 10,0	5	10

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 – 10,0	14	28

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Жидкостной хроматограф с диодно-матричным или УФ-спектрофотометрическим детектором

фирма Agilent 1200

Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса ГОСТ 24104-2001 точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г

Колбы мерные		(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

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Колонка хроматографическая размером 4,6 мм × 250мм, зернение 5 мкм	Например, Eclipse XDB-C18
Иономер И-135	ГОСТ 22261-94
Электрод стеклянный	ТУ 25-07-567-69
Плитка электрическая	ГОСТ 14919-83Е
Аппарат для встряхивания	
Мембранный фильтр Millipore с размером пор 0,45 мкм	фирма Hewlett Packard

3.3 Реактивы и материалы

L-карнитин, содержание основного вещества более 99,8 %	фирма «Sigma-Aldrich»
Натрия гидроокись, ч.д.а. или х.ч., водный раствор массовой концентрации 0,4 г/дм ³	ГОСТ 4328-77
Цинк уксуснокислый 2-водный, ч.д.а, 30% водный раствор	ГОСТ 5823-78
Додецилсульфат натрия	фирма «Sigma-Aldrich»
Кислота о-фосфорная, х.ч.	ГОСТ 6552-72
Ацетонитрил для ВЭЖХ	фирма «Sigma-Aldrich»
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Бумага фильтровальная «красная лента» или «синяя лента»	ТУ 6-09-1678-95

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 L-карнитина подщелоченной дистиллированной водой при нагревании 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 L-карнитина

8.2.1.1 Приготовление основного стандартного раствора L-карнитина концентрацией 200 мкг/см³

Навеску 0,02 г ± 0,0001 г кристаллического L-карнитина 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 L-карнитина

Градуировочные растворы L-карнитина концентрацией 10 мкг/см³, 8 мкг/см³, 5 мкг/см³, 2 мкг/см³, 1 мкг/см³, готовят по схеме, представленной в таблице 3. Аликвотные части основного стандартного раствора L-карнитина переносят в мерные колбы и доводят дистиллированной водой до метки при (20±2)°С.

Таблица 3 – Схема приготовления градуировочных растворов L-карнитина

№ градуировочного раствора	Объем аликвотной части основного стандартного раствора L-карнитина, см ³	Объем мерной колбы, см ³	Концентрация L-карнитина в градуировочном растворе, мкг/см ³
1	5	100	10
2	4	100	8
3	2,5	100	5
4	1	100	2
5	0,5	100	1

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

8.2.2 Приготовление буферного раствора (0,005 М раствор додецисульфата натрия)

1,4 г ± 0,001 додецилсульфата натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, добавляют 400-500 см³ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения, доводят дистиллированной водой до метки. Полученный раствор доводят до рН=2,5 ортофосфорной кислотой.

8.2.3. Приготовление подвижной фазы

850 см³ буферного раствора, полученного по п.8.2.2 смешивают с 350 см³ ацетонитрила. Раствор фильтруют через фильтровальную бумагу «красная лента».

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	35% ацетонитрила + 65% буферного раствора
Объем вводимой пробы	10 мкл
Скорость подачи подвижной фазы	1,0 см ³ /мин
Температура колонки	25°C
Длина волны	210 нм
Время удерживания L-карнитина	7,5 ± 1,0 мин

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 L-карнитина 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 L-карнитина;
- X - концентрация L-карнитина 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 L-карнитина в выбранном градуировочном растворе и его фактической концентрацией, выраженной в процентах, не должна превышать норматива контроля $K_{гр} = 15 \%$.

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

8.6 Подготовка анализируемых образцов

Отбор проб осуществляется согласно ТНПА на продукцию.

Анализируемый продукт (400 – 500 г) или БАД (25- 50 г) измельчают и тщательно перемешивают.

Навеску образца 1,5 – 2 г, взвешенную с точностью $\pm 0,01$ г, помещают в мерную колбу вместимостью 250 см^3 , добавляют 125 см^3 горячей ($60-65^\circ\text{C}$) дистиллированной воды, подщелоченной раствором NaOH массовой концентрации $0,4 \text{ г/дм}^3$ (рН 8,0-8,5) и встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 30 минут. Затем охлаждают до комнатной температуры, добавляют 30 см^3 30 % раствора ацетата цинка и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают. 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.

10 Обработка результатов измерений

Содержание L-карнитина в мг/кг рассчитывают по формуле:

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

где C - концентрация определяемого L-карнитина, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3 ;

V - объем экстракта, см^3 (250 см^3);

m - масса навески, г

За результат анализа принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Вычисления проводят до второго десятичного знака, с последующим округлением до первого.

Допустимое расхождение между параллельными измерениями двух проб не должно превышать 5,0 %

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

11 Оформление результатов измерений

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.

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

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

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

$$|X_1 - X_2| < r_{\text{абс}} \quad (6)$$

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 измерений

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 L-карнитина 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:

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

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»

Ведущий лаборант ХПП ГУ «РНПЦ гигиены»

О.В. Шуляковская

Л.Л. Бельшева

Т.В. Корбут

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.