|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ**  **(ЕАСС)**  **EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION**  **(EASC)** | | |
|  | **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ**  **СТАНДАРТ** | **ГОСТ**  *(проект, KZ,*  *первая редакция)* |

**Продукты пищевые**

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРОЗАМИНОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия*

# Минск

**Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации**

**202\_**

**Предисловие**

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским государственным предприятием на праве хозяйственного ведения «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан на основе собственного аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в разделе 4

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол №\_\_\_\_\_от\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)

За принятие проголосовали:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Краткое наименование страны по МК  (ИСО 3166) 004–97 | Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97 | Сокращенное наименование  национального органа  по стандартизации |
|  |  |  |

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах*

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе (каталоге) «Межгосударственные стандарты», а текст этих изменений – в информационных указателях «Межгосударственные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Межгосударственные стандарты»*

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств

|  |
| --- |
| **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ** |
| **Продукты пищевые** ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРОЗАМИНОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ |

**Дата введения –**

# 

# 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты (мясные и колбасные изделия, рыбу и рыбные изделия) и продовольственное сырье (зерно, сырое мясо) и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентным детектором для определения массовой концентрации (далее - концентрация) суммы летучих нитрозаминов (далее - НА) – диметилнитрозамин (далее - ДМНА), диэтилнитрозамина (далее - ДЭНА) и дипропилнитрозамин (далее – ДПНА).

**2 Нормативные ссылки**

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 61-75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия.

ГОСТ 112-78 Термометры метеорологические стеклянные. Технические условия.

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки,

колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 2062-77 Реактивы. Кислота бромистоводородная. Технические условия.

ГОСТ 2603-79 Реактивы. Ацетон. Технические условия.

ГОСТ 4166-76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия.

ГОСТ 4201-79 Натрий углекислый кислый. Технические условия.

ГОСТ 4204-77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия.

ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия.

ГОСТ 5821-78 Реактивы. Кислота сульфаниловая. Технические условия.

ГОСТ ISO 5725-6-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

ГОСТ 5955-75 Реактивы. Бензол. Технические условия.

ГОСТ 6466-53 Барометры-анероиды метеорологические. Технические условия. ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 6995-77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия.

ГОСТ 9968-86 Метилен хлористый технический. Технические условия.

ГОСТ 21104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

*проект, KZ, первая редакция*

ГОСТ 28165-89 Приборы и аппараты лабораторные из стекла. Аквадистилляторы. Испарители. Установки ректификационные. Общие технические требования.

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний.

ГОСТ 29227-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

ГОСТ 31948-2012 Лампы разрядные (кроме люминесцентных ламп). Требования безопасности.

Примечание - При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов (и классификаторов) на территории государства по соответствующему указателю стандартов (и классификаторов), составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом, следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку

**3 Сущность метода**

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), хроматографическом разделении и количественном определении образовавшихся производных на жидкостном хроматографе с флуоресцентным детектором.

Измерения результатов исследования образцов, содержащих НА, производится жидкостной хроматографией с флуориметрическим детектором 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.

**4 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы**

4.1 При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и оборудование:

4.1.1 Хроматограф жидкостной с флуоресцентным детектором.

4.1.2 Колонка для жидкостной хроматографии металлическая (250×4,6 мм), 5 мкм.

4.1.3 Весы лабораторные электронные с точностью взвешивания 0,0001 г по   
ГОСТ 21104.

4.1.4 Термометр лабораторный с пределами измерений от 0 °С до 100 °С по   
ГОСТ 28498.

4.1.5 Микрошприц для хроматографа, объемом 50 мкл, с ценой деления 1 мкл.

4.1.6 Пипетки 1-1-1-0,1; 1-1-1-1; 1-1-1-2; 1-1-1-5 по ГОСТ 29227.

4.1.7 Колба мерная 11-1-5 (25; 100; 250; 500 мл) по ГОСТ 1770.

4.1.8 Цилиндр мерный на 50; 100; 250 см3 по ГОСТ 1770.

4.1.9 Пробирка со шлифом на 5; 10 см3 по ГОСТ 1770.

4.1.10 Ротационный вакуумный испаритель по ГОСТ 28165.

4.1.11 Баня водяная, способная обеспечить температуру нагревания (40 ± 2) °C.

4.1.12 Воронки по ГОСТ 25336.

4.1.13 Воронки конические, стеклянные диаметром от 30 до 33 мм по ГОСТ 25336.

4.1.14 Мясорубка и измельчитель.

4.1.15 Фарфоровые чашки для выпаривания (диаметр 55 мм, объем 20 см3).

4.1.16 УФ-лампа по ГОСТ 31948.

4.1.17 Гигрометр психрометрический с диапазоном измерений относительной влажности от 20 % до 90 %.

4.1.18 Барометр-анероид по ГОСТ 112.

4.1.19 Холодильник бытовой с морозильной камерой, цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 0 °С до 5 °С.

4.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы и материалы:

4.2.1 Диметилнитрозамин с плотностью 1,01 г/см3.

4.2.2 Диэтилнитрозамин с плотностью 0,95 г/см3.

4.2.3 Дипропилнитрозамин в метаноле 100 мг.

4.2.4 Метанол х.ч. по ГОСТ 6995.

4.2.5 Ацетон ч.д.а. по ГОСТ 2603.

4.2.6 Ацетонитрил для ВЭЖХ или сорт 1-3.

4.2.7 Кислота бромистоводородная х.ч. по ГОСТ 2062.

4.2.8 Кислота уксусная х.ч. по ГОСТ 61.

4.2.9 Хлористый метилен х.ч. по ГОСТ 9968.

4.2.10 Натрий сернокислый безводный х.ч. по ГОСТ 4166.

4.2.11 Дансилхлорид с объемной концентрацией основного вещества 95 % в   
количестве1 г.

4.2.12 Кислота серная х.ч. по ГОСТ 4204.

4.2.13 Натрия гидроокись х.ч. по ГОСТ 4201.

4.2.14 Натрий углекислый кислый х.ч. по ГОСТ 4201.

4.2.15 Сульфаминовая или сульфаниловая кислота по ГОСТ 5821.

4.2.16 Бензол х.ч. по ГОСТ 5955.

4.2.17 Натрий хлористый х.ч. по ГОСТ 4233.

4.2.18 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.2.19 Фильтры бумажные сорта «синяя лента».

Примечание – Допускается применение других средств измерения, оборудования, вспомогательных устройств, реактивы и материалы по метрологическим, техническим характеристикам и качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

**5 Условия выполнения измерений**

Выполнение измерений осуществляется при следующих условиях:

- температура воздуха при приготовлении растворов, в том числе градуировочных (20± 2) °С;

- температура воздуха при измерении (20 ± 5) °С;

- атмосферное давление от 84 до 106,7 кПа;

- влажность воздуха (65 ± 15) % при температуре 25 °С.

Выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводятся в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору и в соответствии с настоящим стандартом.

**6 Подготовка к выполнению измерений**

**6.1 Подготовка хроматографа**

Подготовку хроматографа к работе проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации.

Условия хроматографирования, обеспечивающие наилучшее разделение пиков, для конкретного хроматографа и колонки подбираются индивидуально.

**6.2 Приготовление растворов**

**6.2.1 Раствор дансилхлорида с концентрацией 0,5 мг/см3**

Навеску дансилхлорида массой 26,3 мг помещают в мерную колбу вместимостью 50 см3 и растворяют в 20 см3 ацетона, доводят до метки ацетоном. Готовый раствор хранят в холодильнике, тщательно предохраняя от попадания влаги. Срок хранения - не более 3 месяцев.

**6.2.2 3 %-ный раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте (денитрозирующий раствор)**

В коническую колбу вместительностью 100 см3 вносят 5 cм3 30 %-ной бромистоводородной кислоты и добавляют 45 см3 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.

**6.2.3 Буферный раствор с pH-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 NaHCО3. Тщательно перемешивают раствор до полного растворения соли, доводят объем смеси до метки дистиллированной водой. Хранят раствор в полиэтиленовой посуде. Срок хранения - 3 месяца.

**6.2.4 Раствор серной кислоты с концентрацией 1 н**

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 температуры окружающей среды. Доводят объем до метки дистиллированной водой. Срок хранения не ограничен.

**6.2.5 Рабочий раствор ДМНА с концентрацией 101 мкг/см3**

В мерную колбу вместимостью 100 см3 помещают 20 см3 метилового спирта. Добавляют 10 мм3 ДМНА микропипеткой на 0,1 см3 (концентрацией 1,01 г/см3) и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

**6.2.6 Рабочий раствор ДЭНА с концентрацией 95 мкг/см3**

В мерную колбу вместимостью 100 см3 помещают 20 см3 метилового спирта. Добавляют 10 мм3 ДЭНА микропипеткой на 0,1 см3 (концентрацией 0,95 г/см3) и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

**6.2.7 Рабочий раствор ДПНА с концентрацией 400 мкг/см3**

В мерную колбу вместимостью 250 см3 количественно переносят стандартный образец состава ДПНА с навеской 100 мг, растворяя его в метиловом спирте, и доводят объем до метки метиловым спиртом. Смесь перемешивают и хранят в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

**6.2.8 Рабочий раствор ДПНА с концентрацией 4 мкг/см3 (внутренний стандарт)**

В мерную колбу вместимостью 100 см3 пипеткой емкостью 1 см3 вносят 1 см3 рабочего раствора ДПНА с концентрацией 400 мкг/см3 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 не более 6 месяцев.

**6.2.9 Подвижная фаза для жидкостного хроматографа - смесь ацетонитрил: вода (7:3)**

В коническую колбу вместимостью 1000 см3 помещают 700 см3 ацетонитрила. Добавляют 300 см3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают и дегазируют. Для дегазации колбу с элюентом помещают на водяную баню при температуре от 40 °С до 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. Срок хранения не ограничен.

**6.2.10 Хлористый метилен**

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

**6.2.11 Приготовление градуировочных растворов**

**6.2.11.1 Приготовление основной смеси ДМНА, ДЭНА и ДПНА с концентрациями компонентов 3,0; 4,5 и 6,0 мкг/см3 соответственно.**

В колбе вместимостью 100 см3 с притертой пробкой смешивают 2,97 см3 раствора ДМНА (95 мкг/см3), 4,74 см3 ДЭНА (101 мкг/см3) и 0,60 см3 ДПНА (400 мкг/см3) пипеткой на 5 см3 и на 0,1 см3. Смесь хранится в посуде из темного стекла в холодильнике (при температуре 4 °С) не более 6 месяцев.

**6.2.11.2 Выделение НА путем отгонки с водяным паром**

В колбу для перегонки вместимостью 500 см3 соединенную с паровиком и прямым холодильником в соответствии с рисунком приложения А настоящего стандарта, поместить 250 см3 дистиллированной воды, добавить 2 см3 стандартной смеси ДМНА, ДЭНА и ДПНА в метаноле пипеткой на 2,0 см3. Содержание НА в водном растворе составляет 6,0; 9,0 и 12,0 мкг соответственно. К смеси добавить 10 г сульфата натрия или сульфата магния, 1 г сульфаминовой кислоты, 10 г хлорида натрия, 10 см3 1 н раствора серной кислоты. Все перемешивают, подсоединяют колбу к системе и отгоняют НА с водяным паром, собирая 250 см3 дистиллята в колбу на 300 см3.

**6.2.11.3 Экстракция НА из дистиллята**

250 см3 дистиллята, полученного 6.2.11.2, помещают в делительную воронку на 500 см3 колбу ополаскивают 20 см3 хлористого метилена, который затем сливают в делительную воронку с экстрактом и производят экстракцию в течении 5 мин. Экстракцию хлористым метиленом повторяют еще дважды порциями по 20 см3 в течение 5 мин. Каждую порцию экстракта сливают через воронку с бумажным фильтром, заполненную 5 г безводного сульфата натрия или сульфата магния в колбу для отгонки на 100 см2. Фильтр с безводным сульфатом натрия промывают 10 см3 экстрагента.

**6.2.11.4 Получение дансилпроизводных НА**

В осушенный экстракт добавляют 2 см3 3 %-ного раствора бромистого водорода в укусной кислоте, приготовленного по п. 10.2.2, перемешивают и оставляют для процесса денитрозирования не менее чем на 30 минут при комнатной температуре. Упаривают хлористый метиден на ротационном испарителе при темпатуре водярой бани не более 30 °С до приблизительно 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 °С.

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 6.2.1, перемешивают и немедленного переносят смесь в пробирку с притертой пробкой вместимостью 5 см3. Плотно закрытую пробирку помещают в водяную баню с температурой 55 °С не менее чем на 40 минут для прохождения процесса получения дансил-производных.

Затем пробирки извлекаются из водяной бани и охлаждаются 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 емкостью 2,0 см3 отбирают 1,62 см3 экстракта и переносят в пробирку емкостью 5 см3 с пришлифованной пробкой. Полученный экстракт выдувают в токе воздуха досуха строго в вытяжном шкафу. К полученному сухому остатку добавляют 1,8 см3 подвижной фазы, плотно закрывают и растворяют сухой остаток путем интенсивного встряхивания. Отстоявшийся раствор является основным раствором для приготовления остальных градуировочных растворов (раствор № 6).

В таблице 1 представлена схема разведения для получения градуировочных растворов. Градуировочные растворы готовятся в пробирках вместимостью 5 см3 при помощи пипеток емкостью 1 и 2 см3 путем последовательного разведения подвижной фазой.

## **Таблица 1 – Приготовление градуировочных растворов и содержание в них НА**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № градуиро- вочного раствора | Объем смеси, см3 | Объем подвижной фазы,  см3 | ДМНА,  мкг/см3 | ДЭНА,  мкг/см3 | ДПНА,  мкг/см3 |
| 1 | 1,0 р-ра № 2 | 1,0 | 0,025 | 0,0375 | 0,050 |
| 2 | 0,5 р-ра № 3 | 2,0 | 0,050 | 0,075 | 0,100 |
| 3 | 0,5 р-ра № 4 | 1,5 | 0,250 | 0,375 | 0,500 |
| 4 | 1,0 р-ра № 5 | 1,0 | 1,000 | 1,500 | 2,000 |
| 5 | 1,0 р-ра № 6 | 0,5 | 2,000 | 3,000 | 4,000 |
| 6 | 1,8 | 0 | 3,000 | 4,500 | 6,000 |

Из раствора № 6 получают раствор № 5 путем смешивания 1,0 см3 основного раствора с 0,5 см3 подвижной фазы, получен раствор общим объемом 1,5 см3 с концентрацией ДМНА, ДЭНА и ДПНА 2,0; 3,0 и 4,0 мкг/мл соответственно.

**6.2.11.5 Приготовление контрольной пробы**

Приготовление контрольной пробы или контроль на реактивы проводится с целью определения наличия НА в применяемых реактивах для их вычитания из результатов анализа.

В колбу для перегонки помещают все используемые реактивы (6.2.11.2) в   
250 см3 дистиллированной воды, добавляют при помощи пипетки емкостью 1 см3 раствор ДПНА концентрацией 4 мкг/см3 в количестве 0,5 см3.

**6.3 Установление градуировочной характеристики**

Хроматографирование градуировочных растворов и контрольной пробы проводится при следующих условиях:

* жидкостной хроматограф с флуоресцентным детектором;
* колонка из нержавеющей стали (250×4 мм), заполненная сорбентом, зернением 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;
* объем вводимой пробы - 20 мкл;
* время удерживания дансилпроизводных устанавливается по градуировочным смесям при подобранных условиях хроматографии.

**6.4 Градуировка хроматографа**

Приготовленные градуировочные смеси используются для градуировки хроматографа.

При условиях хроматографии, указанных в 6.3, записывают не менее трех хроматограмм для каждого из приготовленных растворов и измеряют площади пиков дансилпроизводных диметиламина, диэтиламина и дипропиламина. Определяют среднеарифметическое значение площадей пиков, рассчитанное из площадей хроматограмм.

Численное значение относительных коэффициентов отклика детектора Котн получают из хроматографических данных градуировочных растворов с известными концентрациями ДМНА, ДЭНА и ДПНА по формуле (1):

(1)

где мi – масса введенных в хроматограф ДМНА и ДЭНА, мкг;

Si – площади полученных пиков ДМНА и ДЭНА, см2;

Sвн.ст. – площадь внутреннего стандарта – ДПНА, см2;

Мвн.ст. – масса введенного внутреннего стандарта – ДПНА, мкг.

Численное значение Котн. каждый экспериментатор вычисляет в соответствии с применяемыми средствами измерениями, оборудованиями, вспомогательными устройствами, реактивами и материалами и необходимо пересчитывать при изменении любой из перечисленных составляющих.

**6.5 Контроль градуировочных характеристик**

Контроль градуировочных характеристик осуществляется по внутреннему стандарту, вводимому в контрольную и исследуемую пробу. Площадь вносимого внутреннего стандарта в холостую и исследуемую пробу в одинаковой концентрации не должны отличаться более чем на 10 % от площади, по которой были рассчитаны коэффициенты отклика. Если обнаружится, что результаты сильно отличаются, то необходимо пересчитать коэффициент отклика Котн..

**6.6 Подготовка анализируемых образцов**

Отбирают не менее 1 кг средней пробы пищевого продукта или продовольственного сырья в соответствии с требованиями действующих нормативных документов на каждый вид продукции.

Отобранные образцы можно хранить в морозильной камере при температуре от минус 8 °С до минус 18 °С в течение от 1 до 3 суток в зависимости от сроков реализации продукции.

**7 Проведение анализа**

**7.1 Выделение НА путем отгонки с водяным паром**

Навеску 100 г, измельченного в мясорубке или измельчителе пищевого продукта (напитков 250 см3 или детского питания) помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см3, соединенную с паровиком и прямым холодильником. К продукту добавляют от 100 до 150 см3 дистиллированной воды (в зависимости от влажности продукта) и добавляют при помощи пипетки емкостью 1 см3 раствор ДПНА концентрацией 4 мкг/см3 в количестве 0,5 см3 и перемешивают. В смесь добавляют   
10 г хлорида натрия, 10 г сульфата натрия или магния, 1 г сульфаниловой кислоты,   
10 см3 1 н раствора серной кислоты. Все перемешивают, подсоединяют колбу к системе и отгоняют НА с водяным паром, собирая от 200 до 250 см3 дистиллята. Схема прибора для перегонки с водяным паром изображена в приложении А.

**7.2 Экстракция НА из дистиллята**

От 200 до 250 см3 дистиллята, полученного по 7.1 экстрагируют в делительной воронке хлористым метиленом три раза порциями по 20 см3 в течение 5 мин. Каждую порцию экстракта сливают через воронку с бумажным фильтром, заполненную 5 г безводного сульфата натрия. Фильтр с безводным сульфатом натрия промывают   
10 см3 экстрагента. Далее в осушенный экстракт добавляют 2 см3 3 %-ного раствора бромистого водорода в уксусной кислоте, приготовленного по 6.2.2, 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 °С. 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 °С.

Чашку с сухим остатком охлаждают до температуры окружающей среды. 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 6.2.1, перемешивают и немедленно переносят смесь в пробирку с притертой пробкой вместимостью 5 см3. Плотно закрытую пробирку помещают в водяную баню с температурой 55 °С не менее чем на 40 минут для прохождения процесса получения дансил-производных.

Затем пробирки извлекаются из водяной бани и охлаждаются 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 емкостью 2,0 см3 отбирают 1,62 см3 экстракта и переносят в пробирку емкостью 5 см3 с пришлифованной пробкой. Полученный экстракт выдувают в токе воздуха досуха строго в вытяжном шкафу. К полученному сухому остатку добавляют 0,9 см3 подвижной фазы, плотно закрывают и растворяют сухой остаток путем встряхивания.

Дансилпроизводные анализируют на жидкостном хроматографе, записывая хроматограммы не менее 3-х раз.

**8 Результаты анализа**

Для расчета конечного содержания суммы НА в исследуемом образце замеряют площади пиков дансилпроизводных диметиламина, диэтиламина и дипропиламина в исследуемом образце и в контрольном образце. Рассчитывают содержание, (X мг/кг), суммы НА с использованием внутреннего стандарта по формулам (2) – (8):

(мкг), (2)

|  |  |
| --- | --- |
|  | (3) |
|  | (4) |
|  | (5) |
|  | (6) |
|  | (7) |
|  | (8), |

где mДМНА; mДЭНА - содержание ДМНА и ДЭНА в исследуемом образце, мкг;

Sобр.ДМНА; Sобр.ДЭНА – площади пиков ДМНА и ДЭНА в исследуемом образце, см2;

Sконтр.ДМНА; Sконтр.ДЭНА – площади пиков ДМНА и ДЭНА в контрольном образце, см2;

mвн.ст. – масса ДПНА, введенного в образец и контроль и найденная по градуировочному графику ДПНА, мкг;

Kотн.ДМНА,ДЭНА – относительный коэффициент отклика для ДМНА и ДЭНА;

Р – навеска, г.

Расчет содержания (Х мг/кг) суммы НА с использованием градуировочных графиков:

(9)

где mДМНА; mДЭНА – содержание ДМНА и ДЭНА в исследуемом образце и контрое, вычисленное по градуировочным графикам, мкг;

Р – навеска, г;

Kизвл. – степень извлечения, найденная по ДПНА (по соотношению содержания внесенного ДПНА и полученного после извлечения).

В случае получения результатов анализа с содержанием ДПНА (внутреннего стандарта) выше внесенной величины, что бывает крайне редко, необходимо провести анализ образца без внесения внутреннего стандарта и рассчитать содержание ДПНА, ориентируясь на площади пиков ДМНА и ДЭНА в анализируемой пробе с внесенным ДПНА, т.е. в данном случае контролем за степенью извлечения будут служить пики ДМНА и ДЭНА на обеих хроматограммах и присутствии пика ДПНА на хроматограмме без внесения ДПНА, будет подтверждением его наличия.

В случае получения результатов, выходящих за пределы максимальной концентрации по градуировочному графику, необходимо повторить определение с уменьшенной навеской анализируемого образца.

**9 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;

- фамилию оператора.

Гарантированный результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде (10):

, мк/кг (10)

где - результат измерений, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно п. 12, по результатам не менее 2-х параллельных исследований одного образца;

U(X) - расширенная неопределенность результата измерений , мг/кг. Расширенную неопределенность рассчитывают по формуле (11):

, мк/кг (11)

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

uc (*X*) – суммарная стандартная неопределенность результата измерений   
Х, мг/кг.

**10 Показатели прецизионности**

Относительные значения показателей прецизионности (повторяемости и внутри лабораторной воспроизводимости) при доверительной вероятности Р=0,95 представлены в таблицах 2-3.

## **Таблица 2 - Относительные значения показателей повторяемости и внутри лабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р=0,95 при определении ДМНА**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Диапазон измерений ДМНА  (мг/кг) | Показатель повторяемости,  %  ϭr | Показатель внутрилабораторной воспроизводимости,  %  ϭR | Расширенная относительная стандартная неопределенность,  *% U* |
| от 0,0005 до 0,0050 | 4,0 | 5,4 | 67,0 |
| от 0,0050 до 0,0500 | 5,9 | 6,4 | 22,0 |
| от 0,0500 до 0,5000 | 5,1 | 5,6 | - |

**Таблица 3 - Относительные значения показателей повторяемости и внутри лабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р=0,95 при определении ДЭНА**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Диапазон измерений ДЭНА  (мг/кг) | Показатель повторяемости, % ϭr | Показатель внутрилабораторной воспроизводимости,  %  ϭR | Расширенная относительная стандартная неопределенность,  %  *U* |
| от 0,00075 до  0,00750 | 5,4 | 5,9 | 45,0 |
| от 0,00750 до  0,07500 | 5,3 | 5,8 | 18,0 |
| от 0,07500 до  0,75000 | 5,1 | 6,2 | - |

10.2 Относительные значения пределов повторяемости и внутри лабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р=0,95 указаны в таблицах 4-5.

## **Таблица 4 - Относительные значения пределов повторяемости и внутри лабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р=0,95 при определении ДМНА**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Диапазон измерений ДМНА  (мг/кг) | Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений), %  rn | Предел внутрилабораторной воспроизводимости (для двух результатов анализа), %, Rn |
| от 0,0005 до 0,0050 | 10,5 | 15,0 |
| от 0,0050 до 0,0500 | 16,5 | 17,5 |
| от 0,0500 до 0,5000 | 14,2 | 15,6 |

## **Таблица 5 - Относительные значения пределов повторяемости и внутри лабораторной воспроизводимости при доверительной вероятности Р=0,95 при определении ДЭНА**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Диапазон измерений ДЭНА  (мг/кг) | Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений), %  rn | Предел внутрилабораторной воспроизводимости (для двух результатов анализа),  %  Rn |
| от 0,00075 до 0,00750 | 15,1 | 16,4 |
| от 0,00750 до 0,07500 | 14,7 | 16,1 |
| от 0,07500 до 0,75000 | 14,4 | 17,4 |

**11 Проверка приемлемости результатов испытаний**

Проверку приемлемости результатов осуществляют согласно 5.2.2.1   
ГОСТ ISO 5725-6. Два результата испытаний должны быть получены в условиях повторяемости. В процессе внутреннего оперативного контроля проводят контроль стабильности градуировочного графика, определяют соответствие полученных результатов пределам повторяемости и воспроизводимости, нормативу точности.

Контроль стабильности градуировочного графика ДПНА проводится ежедневно с контрольной пробой. Вносится концентрация ДПНА, лежащая в середине концентраций градуировочного графика. Градуировочный график считается стабильным если выполняется условие:

, (12)

где – заданное значение концентрации ДПНА в градуировочном растворе, мкг/см3;

– измеренное значение контцентрации ДПНА в контрольной пробе, мкг/см3;

– норматив контроля градуировочного графика, %, получен согласно   
таблице 6.

**Таблица 6**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Диапазон измерений, мкг/см3 | Норматив контроля Kгр.,% | Uгр.(X), % |
| 0,05-0,50 | 18,95 | 8,6 |
| 0,50-5,00 | 3,38 | 1,6 |

Если абсолютное значение разности rK между двумя результатами испытаний не превышает предел повторяемости rn, то оба результата считаются приемлемыми, и конечный заявляемый результат является их средним арифметическим. rK рассчитывается по формуле:

, (13)

где rK – найденное расхождение между двумя результатами, %;

Смакс – максимальный результат определения;

Смин – минимальный результат определения;

Сср. – среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

Если значение rК меньше либо равно rn, то повторяемость параллельных определений признают удовлетворительной и конечный результат является их средним арифметическим значением, при превышении rК значения rn контроль повторяют. При повторном превышении указанного норматива должны быть выяснены и устранены причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля воспроизводимости.

**12 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 ГОСТ ISO 5725-6.

При построении контрольной карты используют рабочие пробы с ДМНА, ДЭНА и ДПНА. Содержание ДМНА, ДЭНА и ДПНА в рабочей пробе соответствует содержанию их в середине диапазона исследований.

Рассчитывают:

* центральную линию: d2⋅σr ,

где d2=1,128 (коэффициент для расчета центральной линии для n=2);

* границы регулирования: UCL= D2⋅σr ,

где D2=3.686 (коэффициент для расчета границы регулирования для n=2);

* предупреждающие границы: UCL= D2(2)⋅σr,

где D2(2)=2,834 (коэффициент для расчета предупреждающих границ для n=2);

σr – стандартное отклонение повторяемости, м/кг.

Оценку стандартного отклонения повторяемости *sr* получают по формуле:

*, (14)*

где wk= - размах;

х1 и х2 – результаты первого и второго определения, мг/кг;

L – количество проведенных измерений.

Полученные значения записывают в лист данных контрольной карты, по форме, приведенной в таблице 7:

## **Таблица 7**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Дата проведения анализа | Наблюдаемые значения | | Размах w | Описание |
| X1ДМНА(ДЭНА) | X2ДМНА(ДЭНА) |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  | Сумма |  |
|  |  |  | Среднее значение |  |

## 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.

**Приложение А**

*(обязательное)*

## 

Условное обозначение:

1 - Паровик; 2 - Дистиллированная вода; 3 - Круглодонная колба; 4 - Гомогенизат исследуемого продукта; 5 - Баня с глицерином; 6 – Насадка Вюрца; 7 – Трубка на шлифе; 8 – Насадка-барбатер; 9 – Холодильник Либиха; 10 – Аллонж; 11 – Приемник.

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

|  |  |
| --- | --- |
| МКС 67.220.20, IDT |  |
| **Ключевые слова:** нитрозамины; пищевые продукты; продовольственное сырье; хроматографический метод. | |

**РАЗРАБОТЧИК**

РГП на ПХВ «Казахстанский институт стандартизации и метрологии» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

**Руководитель**

**Департамента разработки**

**стандартов и фонда НТД А. Сопбеков**

**Заместитель руководителя**

**Департамента разработки**

**стандартов и фонда НТД Е. Ялынская**

**Ведущий специалист**

**Департамента разработки**

**стандартов и фонда НТД Н. Жакиш**