Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение массовых концентраций фталатов (диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата) в молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3160—14

Издание официальное

Москва • 2015

цифровая копия

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение массовых концентраций фталатов (диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата) в молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3160—14

ББК 51.23
И37

И37 **Измерение** массовых концентраций фталатов (диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата) в молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1311—7

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (Т. С. Уланова, Н. В. Зайцева, Т. Д. Карнажицкая, Е. О. Пшеничникова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 26 декабря 2013 г. № 4).

3. Утверждены Врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации А. Ю. Поповой 24 февраля 2014 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 02.04.15

Формат 60x84/16 Усл. печ. л. 1,16
Тираж 150 экз. Заказ 31

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

Содержание

1. Назначение и область применения 4
2. Физико-химические и токсикологические свойства 5
3. Метрологические характеристики методики выполнения измерений 6
4. Метод измерения 6
5. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы 7
6. Требования безопасности и охраны окружающей среды 8
7. Требования к квалификации оператора 9
8. Условия измерений 9
9. Подготовка к выполнению измерений 9
10. Выполнение измерений 14
11. Обработка результатов измерений 16
12. Оформление результатов измерений 18
13. Контроль качества результатов измерений 18

УТВЕРЖДАЮ
Врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации
А. Ю. Попова
24 февраля 2014 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение массовых концентраций фталатов (диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата) в молоке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3160—14

Свидетельство об аттестации № 88-16374-243-01.00076-2012 от 26.11.2012.

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для измерения массовых концентраций фталатов (диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата) в молоке (молоко сырое, пастеризованное, ультрапастеризованное, стерилизованное, топленое, молоко цельное, обезжиренное, питьевое)* в диапазоне концентраций 0,1—4,0 мг/дм^3 для диметилфталата и ди(2-этилгексил)фталата, 0,2—4,0 мг/дм^3 для диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата.

1.2. Методические указания по измерению массовых концентраций фталатов в молоке предназначены для органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополу-

* *Термины и определения приведены в соответствии с ГОСТ Р 52738—2007.*

чия человека и других служб, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также других лабораторий, аккредитованных в установленном порядке.

1.3. Методические указания носят рекомендательный характер.

2. Физико-химические и токсикологические свойства

Фталаты – диэфиры 1,2-бензолдикарбоновой кислоты (о-фталевой кислоты). Общая формула $C_8H_4O_4R_1R_2$, где R – спиртовый остаток. Фталаты добавляют в качестве пластификаторов для придания эластичности в полимерные материалы при изготовлении предметов промышленного, бытового, пищевого и медицинского назначения. Гигиенические нормативы в Российской Федерации не установлены.

Диметилфталат (ДМФ), диэтилфталат (ДЭФ), дибутилфталат (ДБФ), бензилбутилфталат (ББФ) – бесцветные маслянистые жидкости без запаха или со слабым запахом, ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ) – прозрачная бесцветная жидкость со слабым запахом.

	ДМФ	ДЭФ	ДБФ	ББФ	ДЭГФ
CAS	131-11-3	93952-12-6	93952-11-5	93951-88-3	117-81-7
Формула	$C_{10}H_{10}O_4$	$C_{12}H_{14}O_4$	$C_{16}H_{22}O_4$	$C_{19}H_{20}O_4$	$C_{24}H_{38}O_4$
Молекулярная масса	194,19	222,24	278,35	312,4	390,57
$T_{пл.}$ °C	2	– 40	– 35	– 35	– 46 (5 мм рт. ст.)
$T_{кип.}$ °C	282	296,1	340	370	231
Плотность, г/см^3	1,189	1,118	1,047	1,111	0,986
Растворимость в воде, г/100 см^3	0,5	0,15	0,1	0,00037	0,01
Давление насыщенных паров, кПа	1,67 (при 150 °C)			< 0,1 (при 110 °C)	
ПДК, мг/дм^3	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует

Краткая токсикологическая характеристика

Фталаты проявляют мутагенный, эмбриотоксический и репротоксический эффекты, снижают активность гормонов печени. Ди(2-этилгексил)фталат является эндокринным дизраптором, нарушающим гормональный метаболизм, обладает канцерогенными свойствами [4].

3. Метрологические характеристики методики выполнения измерений

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значения погрешности (и её составляющих) результатов измерений не превышают значений, приведенных в табл. 1.

Таблица 1

Диапазон измерений, значения точности (правильности и прецизионности) методики

Объект измерения	Диапазон измерений массовой концентрации фталатов, мг/дм^3	Показатель точности (границы относительной погрешности), ±δ, % при $P = 0,95$	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости, r, % (при $P = 0,95$ $n = 2$)
Молоко	Диметилфталат				
	0,1—4 вкл.	39	16	19,5	45
	Диэтилфталат				
	0,2—4 вкл.	35	14	17,5	39
	Дибутилфталат				
	0,2—4 вкл.	36	15	18	42
	Бензилбутилфталат				
	0,2—4 вкл.	36	11	18	31
	Ди(2-этилгексил)фталат				
	0,1—4 вкл.	31	9	15,5	25

4. Метод измерения

4.1. Измерение массовых концентраций диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата основано на двойной экстракции фталатов из молока смесью растворителей (метанола, гексана, изопропанола), очистке экстракта и последующем анализе экстракта на жидкостном хроматографе с использованием диодно-матричного детектора.

4.2. Определению не мешают о-фталевая кислота и ее изомеры.

5. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

5.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором и градиентным насосом, смешивающим два компонента	
Весы лабораторные равноплечные второго класса точности; наибольший предел взвешивания 200 г, диапазон взвешивания по шкале мг от 0 до 100 мг, цена деления делительного устройства – 0,05 мг, погрешность взвешивания по шкале мг ± 0,15 мг	ГОСТ Р 53228—08
Гири $Г_2$-210	ГОСТ 7328—01
Колбы мерные с пробкой 2-25-2, 2-100-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки мерные градуированные 1-2-1-2, 1-2-1-5, 1-2-1-10	ГОСТ 29227—91
Микрошприцы серии МШ-10, диапазон дозируемого объема, мкл 1-10 с ценой деления 0,2 мкл, погрешность 1 %	ТУ 2.833.106—2000

Примечание. Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

5.2. Реактивы

Ди(2-этилгексил)фталат, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества не менее 99,5 %	
Диметилфталат, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества не менее 99,5 %	
Диэтилфталат, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества не менее 99,5 %	
Дибутилфталат, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества не менее 99,5 %	
Бензилбутилфталат, аналитический стандарт с массовой долей основного вещества не менее 98 %	
Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, осч	ТУ 6-09-14-2167—84
Гексан для хроматографии, хч	ТУ 6-09-4521—77

Метанол (метиловый спирт), хч	ГОСТ 6995—77
Изопропанол (изопропиловый спирт), хч	ТУ 2632-015-11291058—95
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Кислота серная, осч	ГОСТ 14262—78
Калий двухромовокислый, хч	ГОСТ 4220—75

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией.

5.3. Вспомогательные устройства и материалы

Колонка металлическая длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми полярными группами С18, зернение 5 мкм	
Предколонка длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми полярными группами С18, зернение 5 мкм	
Пробирка вакуумная стеклянная без наполнителя вместимостью 6 $см^3$	
Шкаф сушильный электрический с диапазоном рабочих температур от 50 до 200 °С	ТУ 16.531.743—83
Центрифуга лабораторная с частотой вращения ротора от 500 до 2 700 об./мин	
Стакан В-1-2000-ТС вместимостью 2 $дм^3$	ГОСТ 25336—82
Стеклянные виалы объемом 1,5 $см^3$ с крышкой	
Шприц медицинский одноразовый типа «Луер» вместимостью 1 $см^3$	ГОСТ Р ИСО 7886—11
Фильтры капроновые с диаметром пор не более 5 мкм	

Примечание. Допускается использование других вспомогательных устройств аналогичного назначения, технические характеристики которых не уступают указанным, а также материалов, обеспечивающих нормативы точности при проведении измерений.

6. Требования безопасности и охраны окружающей среды

6.1. При выполнении измерений следует соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007—76, требования электробезопасности при работе

с электроустановками в соответствии с ГОСТ 12.1.019—2009, а также требования, изложенные в технической документации на эксплуатацию жидкостного хроматографа.

6.2. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83.

6.3. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и 2.2.5.2308—07.

7. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц, имеющих квалификацию не ниже инженера-химика с опытом работы на жидкостном хроматографе, освоивших метод измерений и получивших удовлетворительные результаты оперативного контроля процедуры измерений.

8. Условия измерений

8.1. При подготовке к проведению измерений и приготовлении растворов соблюдают следующие условия:

– температура воздуха (20 ± 5) °С;

– атмосферное давление (630—800) мм рт. ст.;

– влажность воздуха не более 80 %.

8.2. Выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендуемых технической документацией прибора.

9. Подготовка к выполнению измерений

При подготовке к выполнению измерений проводят следующие работы: подготовка посуды, приготовление растворов, подготовка хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики.

9.1. Подготовка посуды

Используемую посуду вымыть с поверхностно-активным моющим средством, замочить на 1 ч в хромовой смеси, промыть проточной водой, ополоснуть дистиллированной водой, высушить в сушильном шкафу при температуре 105 °С. Перед использованием сухую посуду обработать ацетонитрилом, высушить при комнатной температуре.

9.2. Приготовление растворов

9.2.1. *Элюент для хроматографии.* Смесь ацетонитрила с дистиллированной водой. Состав элюента задают на двух каналах насоса в градиентном и изократическом (для ди(2-этилгексил)фталата) режимах.

9.2.2. *Исходный раствор диметилфталата для градуировки.* Навеску диметилфталата массой (0,250 ± 0,001) г вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и перемешивают. Массовая концентрация диметилфталата в исходном растворе составляет 2,50 мг/см^3. Срок хранения раствора 3 месяца при температуре 4 °С.

9.2.3. *Исходный раствор диэтилфталата для градуировки.* Навеску диэтилфталата массой (0,250 ± 0,001) г вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и перемешивают. Массовая концентрация диэтилфталата в исходном растворе составляет 2,50 мг/см^3. Срок хранения раствора 3 месяца при температуре 4 °С.

9.2.4. *Исходный раствор дибутилфталата для градуировки.* Навеску дибутилфталата массой (0,250 ± 0,001) г вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и перемешивают. Массовая концентрация дибутилфталата в исходном растворе составляет 2,50 мг/см^3. Срок хранения раствора 3 месяца при температуре 4 °С.

9.2.5. *Исходный раствор бензилбутилфталата для градуировки.* Навеску бензилбутилфталата массой (0,250 ± 0,001) г вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и перемешивают. Массовая концентрация бензилбутилфталата в исходном растворе составляет 2,50 мг/см^3. Срок хранения раствора 3 месяца при температуре 4 °С.

9.2.6. *Исходный раствор ди(2-этилгексил)фталата для градуировки.* Навеску ди(2-этилгексил)фталата массой (0,250 ± 0,001) г вносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3, доводят до метки ацетонитрилом и перемешивают. Массовая концентрация ди(2-этилгексил)фталата в исходном растворе составляет 2,50 мг/см^3. Срок хранения раствора 3 месяца при температуре 4 °С.

9.2.7. *Раствор для идентификации диметилфталата.* В мерную колбу вместимостью 25 см^3 вносят микрошприцем 2,5 мкл исходного раствора диметилфталата для градуировки и доводят содержимое колбы ацетонитрилом до метки. Массовая концентрация диметилфталата составляет 0,25 мг/дм^3. Используют свежеприготовленный раствор.

9.2.8. *Раствор для идентификации диэтилфталата.* В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ вносят микрошприцем 2,5 мкл исходного раствора диметилфталата для градуировки и доводят содержимое колбы ацетонитрилом до метки. Массовая концентрация диэтилфталата составляет 0,25 $мг/дм^3$. Используют свежеприготовленный раствор.

9.2.9. *Раствор для идентификации дибутилфталата.* В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ вносят микрошприцем 25 мкл исходного раствора дибутилфталата для градуировки и доводят содержимое колбы ацетонитрилом до метки. Массовая концентрация дибутилфталата составляет 2,5 $мг/дм^3$. Используют свежеприготовленный раствор.

9.2.10. *Раствор для идентификации бензилбутилфталата.* В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ вносят микрошприцем 2,5 мкл исходного раствора бензилбутилфталата для градуировки и доводят содержимое колбы ацетонитрилом до метки. Массовая концентрация бензилбутилфталата составляет 0,25 $мг/дм^3$. Используют свежеприготовленный раствор.

9.2.11. *Раствор для идентификации ди(2-этилгексил)фталата.* В мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ вносят микрошприцем 2,5 мкл исходного раствора ди(2-этилгексил)фталата для градуировки и доводят содержимое колбы ацетонитрилом до метки. Массовая концентрация ди(2-этилгексил)фталата составляет 0,25 $мг/дм^3$. Используют свежеприготовленный раствор.

9.2.12. *Хромовая смесь.* В термостойкий стакан вместимостью 2 $дм^3$ насыпают 50 г калия двухромовокислого, осторожно приливают по палочке частями, тщательно перемешивая, 1 $дм^3$ концентрированной серной кислоты.

9.3. Подготовка хроматографической колонки

Колонку устанавливают в хроматограф и подают элюент со скоростью 1,0 $см^3$/мин до установления равновесия колонки, которое определяют по стабильности нулевой линии детектора.

9.4. Установление градуировочных характеристик

9.4.1. Градуировочные характеристики, выражающие зависимости площадей пиков на хроматограмме (единицы оптической плотности, е.о.п.) от массовых концентраций диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата, устанавливают на градуировочных растворах диметилфталата, диэтилфталата,

дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в молоке методом абсолютной градуировки. Градуировочную характеристику для определения диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата устанавливают по результатам измерений трех серий из пяти градуировочных растворов с различными массовыми концентрациями определяемых фталатов в каждой серии. Градуировочную характеристику для определения диметилфталата, ди(2-этилгексил)фталата устанавливают по результатам измерений трех серий из шести градуировочных растворов с различными массовыми концентрациями определяемых фталатов в каждой серии.

9.4.2. Градуировочные растворы готовят в мерных колбах вместимостью 25 см^3. Для этого в каждую колбу вносят исходный раствор для градуировки в соответствии с табл. 2, доводят молоком до метки и перемешивают содержимое колбы. В соответствии с п. 10 проводят анализ молока на содержание фталатов. При наличии анализируемых веществ в холостой пробе вычитают их фоновое содержание при построении градуировочного графика.

Таблица 2

Растворы для установления градуировочной характеристики диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в молоке

Номер раствора	1	2	3	4	5	6
Объем исходного раствора, мкл	1	2	4	10	20	40
Массовая концентрация диметилфталата в молоке, мг/дм^3	0,1	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0
Массовая концентрация диэтилфталата в молоке, мг/дм^3	–	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0
Массовая концентрация дибутилфталата в молоке, мг/дм^3	–	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0
Массовая концентрация бензилбутилфталата в молоке, мг/дм^3	–	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0
Массовая концентрация ди(2-этилгексил)фталата в молоке, мг/дм^3	0,1	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0

9.4.3. В вакуумную стеклянную пробирку вместимостью 6 см^3 переносят 1,5 см^3 каждого градуировочного раствора определяемых фталатов, добавляют 3,6 см^3 смеси метанол–гексан–изопропанол

(1,5 : 2,0 : 0,1), закрывают пробкой, интенсивно перемешивают в течение 5 мин. Содержимое пробирки центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 2 000 оборотов в минуту. После расслоения жидкостей верхний слой (экстракт 1) переносят в новую вакуумную пробирку. Проводят повторную экстракцию молока, добавляя к нижнему слою 3,6 см^3 смеси метанол–гексан–изопропанол (1,5 : 2 : 0,1), интенсивно перемешивая и центрифугируя смесь в течение 10 мин. Отбирают верхний слой (экстракт 2). Объединенный экстракт высушивают в токе воздуха, сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила, очищают от молочного жира, для чего добавляют в пробирку 1 см^3 гексана, закрывают пробкой, тщательно перемешивают в течение 1 мин. После расслоения жидкостей гексановый (верхний) слой удаляют, а ацетонитрильный (нижний) слой фильтруют через капроновый фильтр, используя медицинский шприц типа «Луер», в стеклянную виалу и аликвотную часть (20 мм^3) анализируют на жидкостном хроматографе в условиях хроматографирования.

9.4.4. Условия хроматографирования:

колонка 2,1 мм × 150 мм, заполненная сорбентом С18;

подвижная фаза для анализа диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата – смесь ацетонитрила и воды в градиентном режиме: увеличение ацетонитрила с 37 до 40 % от 0 до 1 мин, увеличение ацетонитрила с 40 до 75 % от 1 до 3 мин, уменьшение ацетонитрила с 75 до 50 % от 3 до 4 мин, увеличение ацетонитрила с 50 до 90 % от 4 до 6 мин, уменьшение ацетонитрила с 90 до 37 % от 6 до 10 мин;

подвижная фаза для анализа ди(2-этилгексил)фталата – смесь ацетонитрила и воды в соотношении 85 : 15;

скорость движения элюента	1,0 см^3/мин;
температура термостата колонки	30 °С;
ультрафиолетовый детектор:	
длина волны	198 нм.

9.4.5. Градуировочный коэффициент рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{C_i}{S_i}}{n}, \text{ где}$$

C_i – массовые концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в градуировочном растворе, мг/дм^3;

S_i – среднее значение трех измерений площади пика диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата i-й концентрации, расхождение между минимальным и максимальным значением из которых не должно превышать 4 % относительно среднего значения S_i, единицы оптической плотности (е.о.п.);

n – количество градуировочных растворов.

9.4.6. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят 1 раз в квартал в анализируемой серии измерений. Образцами для контроля стабильности являются градуировочные растворы, выбранные таким образом, чтобы массовая концентрация концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата соответствовала нижней, верхней границам и середине диапазона построения градуировочной характеристики. Градуировочная характеристики признается стабильной при выполнении условия:

$$|C_m - C| \leq 0{,}10 \cdot C, \text{ где}$$

C – заданная массовая концентрация диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в градуировочном растворе;

C_m – результат измерения массовой концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в образце для градуировки.

При невыполнении условия стабильности градуировочной характеристики эксперимент повторяют с другим градуировочным раствором. При повторном невыполнении условия стабильности градуировочной характеристики выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики.

10. Выполнение измерений

10.1. Отбор проб

Отбор проб молока осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ 3622—68. Отобранные образцы упаковывают в стеклянные банки с притертыми крышками. Срок хранения проб до 3 суток при температуре 4 °С, более 3 суток – при температуре –15 °С.

10.2. Порядок выполнения измерений

10.2.1. Выполняют два параллельных измерения массовой концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в пробе молока. В стеклянную вакуумную пробирку вместимостью 6 см^3 добавляют 1,5 см^3 анализируемого молока, добавляют 3,6 см^3 смеси растворителей (метанол, гексан и изопропанол в объемном отношении 1,5 : 2,0 : 0,1), закрывают пробкой, интенсивно перемешивают в течение 5 мин. Содержимое пробирки центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 2 000 оборотов в минуту. После расслоения жидкостей верхний слой (экстракт 1) переносят в новую стеклянную пробирку. Нижний слой повторно экстрагируют: снова добавляют 3,6 см^3 смеси растворителей (метанол, гексан и изопропанол в объемном отношении 1,5 : 2,0 : 0,1), закрывают пробкой, интенсивно перемешивают в течение 5 мин. Содержимое пробирки центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 2 000 оборотов в минуту. После расслоения жидкостей отбирают верхний слой (экстракт 2). Экстракты объединяют и высушивают в токе воздуха. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и очищают от молочного жира, для чего добавляют в пробирку 1 см^3 гексана, закрывают пробкой, интенсивно встряхивают в течение 1 мин, центрифугируют 10 мин. После расслоения жидкостей гексановый (верхний) слой удаляют, а ацетонитрильный (нижний) слой фильтруют через капроновый фильтр, используя медицинский шприц типа «Луер», в стеклянную виалу. Аликвотную часть (20 мм^3) анализируют на жидкостном хроматографе в условиях, указанных в п. 9.4.4.

10.2.2. Выполняют измерение фонового содержания фталатов в объеме экстрагента, взятого на анализ. С этой целью 7,2 см^3 смеси растворителей (метанол, гексан и изопропанол в объемном отношении 1,5 : 2,0 : 0,1), используемой для двойной экстракции фталатов из молока, переносят в стеклянную пробирку вместимостью 6 см^3, высушивают в токе воздуха, сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила. Раствор фильтруют через капроновый фильтр, используя медицинский шприц типа «Луер», в стеклянную виалу и аликвотную часть (20 мм^3) анализируют на жидкостном хроматографе в условиях, указанных в п. 9.4.4. Измерение холостой пробы экстрагента выполняют при анализе каждой серии образцов молока.

10.2.3. Идентификацию диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата проводят путем сравнения времен удерживания хроматографических пиков в анализи-

руемой пробе и в растворах для идентификации ди(2-этилгексил)фталата, приготовленных по пп. 9.2.7—9.2.11.

11. Обработка результатов измерений

11.1. Массовые концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в молоке (мг/дм^3) вычисляют по формуле:

$$C_i = (S_i - S_{хол}) \cdot K \text{, где}$$

C_i – массовые концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в анализируемой пробе, мг/дм^3;

S_i – площадь пика диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в анализируемой пробе, е.о.п.;

$S_{хол}$ – площадь пика диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в холостой пробе, е.о.п.;

K – градуировочный коэффициент.

11.2. За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости C_1, C_2 (параллельных определений), для которых выполняется условие:

$$|C_1 - C_2| \le 0,01 \cdot r \cdot \frac{C_1 + C_2}{2} \text{, где} \qquad (1)$$

r – предел повторяемости. Значения предела повторяемости приведены в табл. 3.

Таблица 3

Значения пределов повторяемости, воспроизводимости и критического диапазона при доверительной вероятности $P = 0,95$

Наименование определяемого компонента, диапазон измерений, мг/дм^3	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости), r, %	Критический диапазон (относительное значение допускаемого расхождения между наибольшим и наименьшим четырех результатов измерений, полученных в одной лаборатории в условиях повторяемости), $CR_{0,95}(4)$, %	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях), R, %
Диметилфталат			
от 0,1 до 4 вкл.	45	58	55
Диэтилфталат			
от 0,2 до 4 вкл.	39	50	49
Дибутилфталат			
от 0,2 до 4 вкл.	42	54	50
Бензилбутилфталат			
от 0,2 до 4 вкл.	31	40	50
Ди(2-этилгексил)фталат			
от 0,1 до 4 вкл.	25	32	43

При невыполнении условия (1) получают дополнительно еще два результата измерений. За результат измерений принимают среднее арифметическое четырех результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, для которых выполняется условие:

$$\left|C_{max,4} - C_{min,4}\right| \le 0,01 \cdot \mathrm{CR}_{0,95}(4) \cdot \frac{C_1 + C_2 + C_3 + C_4}{4}, \text{ где} \qquad (2)$$

$CR_{0,95}(4)$ – критический диапазон. Значения критического диапазона приведены в табл. 3. При невыполнении условия (2) в качестве окончательного результата измерений принимают медиану четырех результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (параллельных определений). Дополнительно выявляют и устраняют причины, приводящие к невыполнению условия (1).

11.3. Расхождение между результатами измерений, полученных в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости:

$$\left|\bar{C}_1 - \bar{C}_2\right| \le 0{,}01 \cdot \mathrm{R} \cdot \frac{\bar{C}_1 + \bar{C}_2}{2}, \text{ где} \qquad (3)$$

$\bar{C}_1$ и $\bar{C}_2$ – результаты измерений массовой концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата, полученные в разных лабораториях – средние арифметические двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, для которых выполняется условие (1).

При выполнении условия (3) приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднее арифметическое значение. Значение предела воспроизводимости приведено в табл. 3. При невыполнении условия (3) могут быть проведены процедуры проверки приемлемости согласно раздела 5 ГОСТ Р ИСО 5725-6.

12. Оформление результатов измерений

Результат измерений представляют в виде ($\bar{C} \pm \Delta$) мг/дм^3, где

$\bar{C}$ – результат измерений, мг/дм^3;

Δ – характеристика погрешности, мг/дм^3 при $P = 0{,}95$;

значение Δ рассчитывают по формуле: $\Delta = \dfrac{\delta \cdot C}{100}$, где значение δ приведено в табл. 1.

13. Контроль качества результатов измерений

Обеспечение достоверности измерений в пределах лаборатории организуют и проводят путем проведения оперативного контроля процедуры измерений и контроля стабильности результатов измерений в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6)—2002 и РМГ 76—2004.

Периодичность получения результатов контрольных процедур и формы их регистрации приводят в документах лаборатории, устанавливающих порядок и содержание работ по организации методов контроля стабильности результатов измерений в пределах лаборатории.

13.1. Алгоритм оперативного контроля процедуры измерений с использованием метода добавок

Оперативный контроль процедуры измерений с использованием метода добавок проводят путем сравнения результата отдельно взятой контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля K.

Результат контрольной процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \left|\overline{C}' - \overline{C} - C_д\right|, \text{ где}$$

$\overline{C}'$ – результат измерений массовой концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в пробе с известной добавкой – среднее арифметическое двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, расхождение между которыми удовлетворяет условию (1);

$\overline{C}$ – результат измерений массовой концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в исходной пробе – среднее арифметическое двух результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, расхождение между которыми удовлетворяет условию (1).

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л,C'_{ср}} + \Delta^2_{л,C_{ср}}}, \text{ где}$$

$\Delta_{л,C'_{ср}}$, $\Delta_{л,C_{ср}}$ – значения характеристики погрешности результатов измерений, установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие массовой концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в пробе с известной добавкой и в исходной пробе соответственно.

Примечание. Допустимо характеристику погрешности результатов измерений при внедрении методики в лаборатории устанавливать на основе выражения: $\Delta_л = 0{,}84 \cdot \Delta$ с последующим уточнением по мере накопления информации в процессе контроля стабильности результатов измерений.

Процедуру измерений признают удовлетворительной при выполнении условия:

$$K_к \le K \qquad (4)$$

При невыполнении условия (4) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (4) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.2. Алгоритм проведения контрольной процедуры при контроле внутрилабораторной прецизионности

Образцами для контроля внутрилабораторной прецизионности являются пробы исследуемого молока (рабочие пробы).

При реализации контрольной процедуры получают два результата контрольных измерений (первичного $\bar{C}_1$ и повторного $\bar{C}_2$) массовой концентрации диметилфталата, диэтилфталата, дибутилфталата, бензилбутилфталата, ди(2-этилгексил)фталата в условиях внутрилабораторной прецизионности.

Результат контрольной процедуры признают удовлетворительным при выполнении следующего условия:

$$\frac{\left|\bar{C}_1 - \bar{C}_2\right|}{\left(\bar{C}_1 + \bar{C}_2\right)/2} \cdot 100\,\% \le R_л \qquad (5)$$

Значение предела внутрилабораторной прецизионности $R_л$ приведено в табл. 4.

Таблица 4

Значение предела внутрилабораторной прецизионности при доверительной вероятности $P = 0{,}95$

Диапазон измерений, мг/дм^3	Предел внутрилабораторной прецизионности (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в одной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности), $R_л$, %
Диметилфталат	
от 0,1 до 4 вкл.	50
Диэтилфталат	
от 0,2 до 4 вкл.	43
Дибутилфталат	
от 0,2 до 4 вкл.	46
Бензилбутилфталат	
от 0,2 до 4 вкл.	34
Ди(2-этилгексил)фталат	
от 0,1 до 4 вкл.	35

При невыполнении условия (3) процедуру повторяют. При повторном превышении предела внутрилабораторной прецизионности выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.