

PRILOGA IV

ANALITSKA METODA ZA DOLOČANJE VINIL KLORIDA, KI IZ MATERIALOV IN IZDELKOV PREHAJA V ŽIVILA

1 NAMEN IN PODROČJE UPORABE

Z metodo se določa vsebnost vinil klorida v živilih.

2 PRINCIP

Vsebnost vinil klorida (v nadaljnjem besedilu: VC) v živilih se določa s plinsko kromatografijo z uporabo "head space" metode.

3 REAGENTI

3.1 Vinil klorid (VC), čistosti večje od 99,5% (v/v).

3.2 N,N-dimetilacetamid (DMA), brez nečistoč, ki imajo enak retenzijski čas kot VC ali kot interni standard iz točke 3.3 te priloge pri pogojih preskušanja.

3.3 Dietileter ali cis-2-buten v DMA iz točke 3.2 te priloge kot raztopina internega standarda. Interni standardi ne smejo vsebovati nikakršnih nečistoč, ki imajo enak retenzijski čas kot VC pri pogojih preskušanja.

3.4 Destilirana ali demineralizirana voda enake čistosti.

4 APARATURA

Opomba

Instrumenti ali deli aparaturne opreme so omenjeni le, če so posebne vrste in izdelani po posebnih specifikacijah. Predvideva se, da so običajne laboratorijske aparature na razpolago.

4.1 Plinski kromatograf z avtomatskim head-space vzorčevalnikom ali s pripomočki za ročno injiciranje vzorca.

4.2 Plamensko ionizacijski detektor ali drugi detektorji, omenjeni v točki 7. te priloge.

4.3 Kolona plinskega kromatografa.

Kolona mora omogočati ločitev vrhov zraka, VC in internega standarda, če je bil uporabljen.

Poleg tega mora sistem v katerem je kombinacija detektorja iz točke 4.2 te priloge in kolone iz točke 4.3 te priloge omogočati, da je signal raztopine z 0,005 mg VC/liter DMA ali 0,005 mg VC/kg DMA najmanj petkrat višji (intenzivnejši) od šuma ozadja.

4.4 Stekleničke za vzorce (viale) s tesnilom iz silikona ali butil kavčuka.

Pri ročnem vzorčenju lahko pri odvzemu vzorca z injekcijsko iglo iz "head space" (plinske faze) v steklenički nastane vakuum. Zato je pri ročnem postopku, pri katerem se pred odvzемом vzorca pritisk v vialah ne poveča, priporočljivo uporabiti večje stekleničke (viale).

4.5 Mikro injekcijske igle

4.6 Plinsko tesne injekcijske igle za ročno head-space vzorčenje

4.7 Analitska tehtnica z najmanjšim razdelkom 0,1 mg

5 POSTOPEK

OPOZORILO: VC je nevarna snov, pri sobni temperaturi je v plinskem stanju. Zato raztopine pripravljamo v dobro prezračevanem digestoriju.

Opombe:

- potrebno je zagotoviti, da ne pride do izgub VC ali DMA,
- pri postopku ročnega vzorčevanja se uporabi interni standard iz točke 3.3 te priloge,
- pri delu z internim standardom je treba v celotnem postopku uporabiti isto raztopino.

5.1 Priprava standardne raztopine VC (raztopina A)

5.1.1 Priprava koncentrirane standardne raztopine VC ca. 2000 mg/kg

Na 0,1 mg točno se stehta primerno stekleno posodico in jo napolni z določeno količino (na pr. 50 ml) DMA iz točke 3.2 te priloge in ponovno stehta. Doda se določeno količino (na pr. 0,1 g) VC (točka 3.1 te priloge) v tekoči ali plinski obliki tako, da se počasi injicira na DMA. VC se lahko dodaja tudi z vpihavanjem v DMA, pri čemer se mora uporabiti pripravo, ki preprečuje izgubo DMA. Ponovno se stehta na 0,1 mg. Počaka se dve uri, da se vzpostavi ravnotežje. Če bomo v postopku uporabljali interni standard, ga dodamo toliko, da je njegova koncentracija v koncentrirani standardni raztopini VC enaka koncentraciji v raztopini internega standarda iz točke 3.3 te priloge. Standardna raztopina se hrani v hladilniku.

5.1.2 Priprava razredčene standardne raztopine VC

Zatehta se določeno količino koncentrirane standardne raztopine VC iz točke 5.1.1 te priloge in se jo razredči do znanega volumna ali znane mase z DMA iz točke 3.2 te priloge ali z raztopino internega standarda iz točke 3.3 te priloge. Koncentracijo nastale razredčene standardne raztopine (raztopina A) se izrazi v mg/l ali mg/kg.

5.1.3 Priprava umeritvene krivulje z raztopino A

Opombe:

- krivulja se določi iz najmanj sedmih parov točk,
- ponovljivost odzivov ⁽¹⁾ mora biti manjša od 0,002 mg VC/l ali kg DMA,
- krivulja se izračuna iz teh točk z metodo najmanjših kvadratov. Regresijska premica se izračuna po naslednji enačbi:

$$y = a_1 X + a_0$$

$$a_1 = \frac{n \sum xy - (\sum x) * (\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a_0 = \frac{(\sum y) + (\sum x^2) - (\sum x) * (\sum XY)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

kjer pomeni:

y = višina ali površina vrhov pri posamezni meritvi,

x = odgovarjajoča koncentracija na regresijski premici,

n = število izvedenih meritev (n ≥ 14).

- krivulja mora biti linearna, to je, standardni odmik (s) razlik med izmerjenimi vrednostmi odzivov (y_i) in odgovarjajočimi vrednostmi odzivov izračunanimi iz regresijske premice (z_i), deljen s srednjo vrednostjo (\bar{y}) vseh odzivov, ne sme biti večji od 0,07.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - z_i)^2}{n - 1}}$$

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i$$

kjer pomeni:

y_i = odziv posamezne meritve (izmerjen),

z_i = odgovarjajoča vrednost odziva (y_i) na izračunani regresijski premici,

$n \geq 14$.

Pripravi se dve seriji po najmanj sedem stekleničk (vial) iz točke 4.4 te priloge. V vsako stekleničko se da tako količino (volumen) razredčene standardne raztopine VC iz točke 5.1.2 te priloge in DMA iz točke 3.2 te priloge ali raztopine internega standarda v DMA iz točke 3.3 te priloge, da je končna koncentracija VC dvojno pripravljenih raztopin približno: 0; 0,005; 0,010; 0,020; 0,030; 0,040; 0,050 itd. mg/l ali mg/kg DMA in da je v vseh stekleničkah enak celotni volumen raztopine. Volumen razredčene standardne raztopine VC iz točke 5.1.2 te priloge je treba izbrati tako, da razmerje med volumnom dodane raztopine VC (ml) in količino (g ali ml) DMA ali raztopine internega standarda iz točke 3.3 te priloge ne presega vrednosti 5. Stekleničke se zatesni in nadaljuje kot je opisano v točkah 5.4.1, 5.4.3, 5.4.5 te priloge. Nariše se diagram, v katerem se na ordinato nanese vrednosti površin (ali višin) vrhov kromatografskih VC obeh serij raztopin ali razmerje teh površin (ali višin) z odgovarjajočimi površinami kromatografskih vrhov internih standardov, na absciso pa vrednosti koncentracij VC raztopin obeh serij.

5.2 Validacija priprave standardnih raztopin, iz točke 5.1 te priloge

5.2.1 Priprava druge standardne raztopine VC (raztopina B)

Postopek, opisan v točkah 5.1.1 in 5.1.2 te priloge, se ponovi, da se dobi drugo razredčeno standardno raztopino s koncentracijo 0,02 mg VC/l ali 0,02 mg VC/kg DMA ali raztopine internega standarda. To raztopino se da v dve steklenički iz točke 4.4 te priloge. Stekleničke se zatesnijo in postopek se nadaljuje kot je opisano v točkah 5.4.1, 5.4.3 in 5.4.5 te priloge.

5.2.2 Validacija priprave raztopine A

Če se povprečje dveh meritev raztopine B s plinskim kromatografom ne razlikuje za več kot 5 % od odgovarjajoče točke umeritvene krivulje iz točke 5.1.3 te priloge, je raztopina A validirana. Če je razlika večja od 5 %, se zavrže vse raztopine, pripravljene po točkah 5.1 in 5.2 te priloge in se postopek ponovi od začetka.

5.3 Priprava krivulje z metodo standardnega dodatka

Opombe:

- krivuljo se določi iz najmanj sedmih parov točk,
- krivulja se izračuna z metodo najmanjših kvadratov (tretji odstavek točke 5.1.3 te priloge)

- krivulja mora biti linearna, to je, standardni odklik (s) razlik med izmerjenimi vrednostmi odziva (y_i) in odgovarjajočimi vrednostmi odziva na regresijski premici (z_i), deljen s srednjo vrednostjo vseh meritev odziva (\bar{y}), ne sme biti večji od 0,07 (četrti odstavek točke 5.1.3 te priloge).

5.3.1 Priprava vzorcev

Pred odvzemom vzorca je potrebno živilo homogenizirati ali zdrobiti na manjše delce in homogenizirati. Vzorec živila za analizo mora biti reprezentativen za živilo, ki se analizira.

5.3.2 Postopek

Pripravi se dve seriji po najmanj sedem stekleničk (vial) iz točke 4.4 te priloge. V vsako se zatehta najmanj 5 g vzorca živila, ki se analizira (točka 5.3.1 te priloge). Zagotovi se, da je v vsaki steklenički enaka količina vzorca. Stekleničke se takoj zaprejo. V vsako stekleničko se doda na vsak gram vzorca po 1 ml destilirane ali demineralizirane vode, najmanj enake čistosti, ali po potrebi ustrezno topilo (opomba: za homogena živila dodatek destilirane vode ni potreben).

V vsako stekleničko se doda tako količino (volumen) razredčene standardne raztopine VC iz točke 5.1.2 te priloge, ki vsebuje interni standard (točka 3.3 te priloge), če je to potrebno, da so končne koncentracije VC: 0; 0,005; 0,010; 0,020; 0,030; 0,040; 0,050 itd mg/kg živila. Zagotoviti je potrebno, da je celotni volumen DMA oziroma DMA z internim standardom (točka 3.3 te priloge) v vsaki steklenički enak. Količina razredčene standardne raztopine VC (točka 5.1.2 te priloge) in po potrebi dodanega DMA mora biti taka, da je razmerje med celotnim volumnom raztopine (μ l) in količino živila (g) v steklenički čim manjše oziroma največ 5 in je enako v vsaki steklenički. Stekleničke se zatesni in nadaljuje kot je opisano v točki 5.4 te priloge.

5.4 Določitev s plinskim kromatografom

5.4.1 Stekleničke se stresa pri čemer tekočina ne sme priti v stik tesnilom (točka 4.4 te priloge), dokler se ne dobi kar najbolj homogena raztopina ali suspenzija vzorca živila.

5.4.2 Vse zatesnjene stekleničke (točki 5.2 in 5.3 te priloge) se postavi v vodno kopel za dve uri pri 60 ± 1 °C, da se vzpostavi ravnotežje. Po potrebi se stekleničke ponovno pretrese.

5.4.3 Nato se vzorec odvzame iz "head-space" (plinske faze) v steklenički. Pri ročnem postopku vzorčevanja se pazi na ponovljivost odvzema vzorcev (točka 4.4 te priloge). Injekcija mora biti predgreta na temperaturo vzorca. Izmeri se površino (ali višino) vrhov VC in internega standarda, če je bil uporabljen.

5.4.4 Nariše se diagram, v katerem so na ordinati vrednosti površin (ali višin) kromatografskih vrhov VC ali razmerje teh površin (ali višin) z odgovarjajočimi vrhovi internih standardov, na abscisi pa količine dodanega VC (mg) glede na količine vzorca živila v vsaki steklenički (kg). Presek na abscisi predstavlja koncentracijo VC v preiskovanem vzorcu živila.

5.4.5 S primernim postopkom se odstrani iz kolone (točka 4.3 te priloge) presežek DMA takoj, ko se vrhovi DMA pojavijo na kromatogramu.

6 REZULTATI

VC, ki preide iz materiala in izdelka v preiskovano živilo, izražen v mg/kg, je povprečje obeh meritev iz točke 5.4 te priloge pod pogojem, da je kriterij ponovljivosti iz točke 8. te priloge izpolnjen.

7 POTRDITEV VSEBNOSTI VC

V primerih ko količina VC, ki preide iz materialov in izdelkov v živila, izračunana po 6 točki te priloge, presega merila, določena v 17. členu pravilnika o izdelkih in snoveh, je treba vrednosti obeh meritev iz točke 5.4 te priloge potrditi na enega od treh načinov:

- z uporabo najmanj ene drugačne kolone (točka 4.3 te priloge) s stacionarno fazo drugačne polarnosti;

Postopek je treba nadaljevati toliko časa, dokler se ne dobi kromatograma, kjer ni prekrivanja kromatografskih vrhov VC in/ali internega standarda z vrhovi sestavin vzorca živila:

- z uporabo drugih detektorjev npr. detektorji mikro-elektrolitske prevodnosti ⁽²⁾;
- z uporabo masne spektrometrije. Če dobimo v masnem spektru ione pri (m/e) 62 in 64 v razmerju 3:1, to najverjetneje potrjuje prisotnost VC. V dvomljivih primerih je treba preveriti ves masni spekter.

8 PONOVLJIVOST

Razlika v rezultatu dveh meritev iz točke 5.4 te priloge istega vzorca, ki potekata istočasno ali v kratkem času ena za drugo in ju opravi ista oseba pod enakimi pogoji, ne sme biti večja od 0,003 mg VC/kg živila.

Opombe:

⁽¹⁾ Glej Priporočilo ISO DIS 5725 : 1977

⁽²⁾ Glej Journal of Chromatographic Science, 12, marec 1974, str. 152