

TARTU ÜLIKOOL
Füüsika-keemiateaduskond
Keemilise füüsika instituut

KADI MÖLDER

**SUDAAN I – IV VÄRVAINETE MÄÄRAMINE
VEDELIKKROMATOGRAAFILISELT**

Magistritöö
füüsikalise ja analüütilise keemia erialal

Juhendaja: dotsent, PhD K. Herodes

Tartu 2007

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUS ÜLEVAADE.....	6
1.1. Sudaanid.....	6
1.2. IARC klassifikatsioon	7
1.3. Miks Sudaanid on ohtlikud?.....	8
1.4. Kuidas satuvad Sudaanid tootesse?.....	10
1.5. Sudaanide leiud	11
1.6. Tasakaalud Sudaanide lahustes	13
1.7. Määramismeetodid	16
1.8. Meetodi valik.....	18
1.9. Meetodi valideerimine.....	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	21
2.1. Aparatuur.....	21
2.1.1. TKI Tartu Labor.....	21
2.1.2. Tartu Ülikooli KK.....	22
2.1.3. Kromatograferimise ja detekteerimise tingimused.....	23
2.1.3.1. TKI Tartu Labor	23
2.1.3.2. Tartu Ülikooli KK	23
2.2. Reaktiivid	25
2.2.1. TKI Tartu Labor.....	25
2.2.2. Tartu Ülikool KK.....	25
2.2.3. Lahuste valmistamine.....	25
2.3. Proovi ettevalmistus	27
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	28
3.1. Meetodi väljatöötamine.....	28
3.1.1. Kromatograafiliste tingimuste välja töötamine.....	28
3.1.2. Proovi ettevalmistuse väljatöötamine	29
3.1.3. Kaksikpiigid Sudaanide analüüsi juures ja nende uurimine.....	30
3.1.4. Praktilised järeldused	32
3.2. Analüüs.....	34
3.2.1. Kalibreerimisgraafiku koostamine.....	34
3.2.2. Valideerimise tulemused	36
3.2.3. Mõõtemääramatus.....	39
3.3. Analüüsitud proovid ja tulemused.....	40
KOKKUVÕTE.....	42
SUMMARY	44

KASUTATUD KIRJANDUS	46
LISAD	49
Lisa 1. Massispektromeetri parameetrid	49
Lisa 2. Sudaani standardlahuse (2 mg/l) UV/Vis kromatogramm	50
Lisa 3. Sudaani standardlahuse (2 mg/l) EIC kromatogramm	51
Lisa 4. Sudaanide MS ² spektrid	52
Lisa 5. Sudaan III “aeglase piigi” ja “kiire piigi” UV/Vis spekter.....	53
Lisa 6. Sudaan I – IV kromatograafilised omadused	54
Lisa 7. Sudaan III “ Kiire” ja “ Aeglase” piigi EIC kromatogramm.....	55
Lisa 8. Sudaan III “aeglase” ja “kiire” piigi UV/Vis spektri muutus ajas.....	56
Lisa 9. Sudaan I- IV standardlahus analüüsituna kasutades erinevaid viaale	57
Lisa 10. Sudaan I – IV kalibratsiooni andmed pimedas ja normaalses valguses kasutades UV/Vis ja MS ² detekteerimist.....	58
Lisa 11. Sudaan III kalibreerimisgraafik pimedas ja valguses	59
Lisa 12. TKI Tartu Labori arvutused	60
Lisa 13. Tartu Ülikooli KK arvutused.....	65
Lisa 14. Standardlahuste ja proovide kromatogrammid.....	70
Lisa 15. Mõõtemääramatuse arvutus.....	72

KASUTATUD LÜHENDID

IARC – (International Agency for Research on Cancer) Rahvusvaheline Vähiuurimiskeskus

ISO – (International Standards Organization) Rahvusvaheline Standardiseerimise
Organisatsioon

CAS Nr. – (Chemical Abstracts Service Registry Number) CAS Registri number

CI – (Chemical Index) värvusindeks

DAD – (Diode Array Detector) diodrividetektor

DMSO – (dimethyl sulfoxide) dimetüülsulfoksiid

ESI – (electrospray ionization) elektropihustus-ionisatsioon

EL – Euroopa Liit

GPC – (Gel-permeation chromatography) geelpuhastus kromatograafia

HPLC – (High Performance Liquid Chromatography) kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

ICC – (Ion Charge Control) ionide laengu kontroll

KK – Tartu Ülikooli Katsekoda

LC/MS – (Liquid Chromatography mass spectrometer) vedelikkromatograaf mass-
spektromeeter

MS – (mass spectrometry) massispektromeetria

ODS – (octadecyl-silica) oktaetsüül-modifitseeritud silikageel

PDA – (Photo Diode Array) fotodiod jada

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed

TKI – Tervisekaitseinspeksioon

TLC – (thin-layer chromatography) õhukesekihi kromatograafia

TOC – (total oxidizable carbon) oksüdeeritava süsiniku sisaldus

UV/Vis – Ultraviolett nähtav valgus

SISSEJUHATUS

Sudaanid I – IV on värvained, mida on mõningates maades hakatud kasutama ka kui toiduvärve. Sudaanid I – IV on tunnustatud kantserogeenseteks mistõttu paljudes riikides ning ühendustes, kaasa arvatud Euroopa Liidus, pole lubatud nende kasutamine toiduvärvidena.

Vastavalt Euroopa Liidu Komisjoni otsustele 2005/402/EL (varasemad redaktsioonid 2003/406/EL ja 2004/92/EL) peab EL-i imporditavatel vürtsipaprika (tšilli) ja vürtsiparikatootel, kurkumal ja palmiõlidel kaasas olema analüüsisertifikaadid, mis tõendavad, et neis ei leidu kõne all olevaid keelatud värvaineid. Liikmesriigid peavad teostama ka pistelist kontrolli imporditavatele ning juba müügil olevates eelnimetatud toodetes [1].

Kuna tegemist on toodete võltsimisega, siis asi võib olla kriminaalselt karistatav. Tänu sellele oli eesmärgiks luua meetod, mis võimaldaks üheselt määrata Sudaan I – IV olemasolu. Sageli on analüüsitav maatriks keeruline ja varieeruv ning tänu sellele tuleks kasutada selektiivseid detektoreid (nt MS).

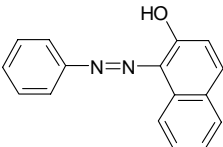
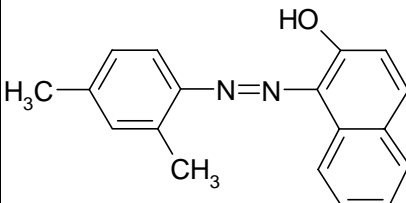
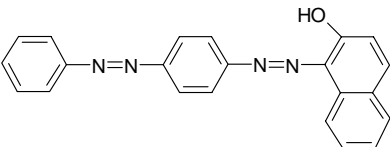
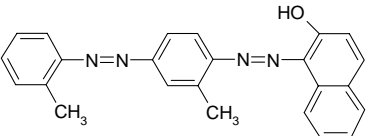
Töö esimeses osas antakse ülevaade Sudaan I, II, III ja Sarlakpunasest (Sudaan IV) ja nende analüüsiks kasutatavatest meetoditest ning teises osas vaadeldakse Sudaan I – IV analüüsil kasutatud metoodikat.

1. KIRJANDUS ÜLEVAADE

1.1. Sudaanid

Sudaanid I – IV (tabel 1) on asovärvained, mida kasutatakse tavaliselt mitmesuguste materjalide, nagu plastiku värvimiseks/toonimiseks, trükivärvina, kütuse erimärgistamiseks ning jalanõude hooldusvahendites ja põrandavahades värvuse andmiseks [2-4]. Teaduses rakendatakse analüütilisel eesmärgil lipiidide värvimiseks [5].

Tabel 1[5]: Sudaan I – IV struktuur ja keemilised nimetused.

Aine	CAS Nr.	CI	Nimetus/sünonüüm
<p><i>Sudaan I</i></p> 	842-07-9	12055	1-(fenüülaso)-2-naftool; 1-benseenaso-2-naftool; Sudan Yellow; 2-hüdrosü-1-fenüülasonaftaleen; 2-hüdrosünaftüül-1-asobenseen Fat soluble Orange
<p><i>Sudaan II</i></p> 	3118-97-6	12140	1-(2,4-dimetüülbensoaso)-2-naftool; Solvent Orange 7; 1-[(2,4-dimetüülfenüül)aso]-2-naftalenool;
<p><i>Sudaan III</i></p> 	85-86-9	26100	1-[4-(fenüülaso)fenüülaso]-2-naftool; Sudaan G; Fat Ponceau G; Solvent Red 23
<p><i>Sudaan IV</i></p> 	85-83-6	26105	1-[[2-metüül-4-[(2-metüülfenüül)aso]aso]fenüül]aso]-2-naftalenool; Sarlakpunane; Solvent Red 24

1.2. IARC klassifikatsioon

Rahvusvahelise Vähiuurimiskeskuse (IARC) järgi on liigitatud Sudaan I, II, III ja Sarlakpunane (Sudaan IV) 3. grupi kantserogeeniks. Järgnevalt vaadeldakse IARC klassifikatsiooni lähemalt.

IARC järgi klassifitseeritakse aineid nende ohtlikkuse järgi nelja gruppi. Nende gruppide kirjeldused on toodud ära allpool.

1. Grupp: ühendid (segud), mis on kantserogeensed inimesele. Kasutatakse, kui on piisavalt tõendeid kantserogeensuse kohta inimesele. Erandina ka ühend või segu, mille puhul kantserogeensus inimestele pole niivõrd hästi tõestatud, kuid on piisavalt tõendeid kantserogeensuse kohta katseloomadel ja on tõendeid selle kohta, et kantserogeensuse mehhanism mõlemal juhul on sama.

2. Grupp

Hõlmab enda all ühendeid, segusid ja kokkupuute situatsioone, kus ühel juhul on peaaegu piisavalt tõendeid kantserogeensuse kohta inimesele ja teisel juhul andmeid inimeste kohta puuduvad, kuid on piisavalt tõendeid katseloomade kohta. Need jagunevad kahte rühma põhinedes epidemioloogilistel, eksperimentaalsetel ja muudel asjakohastel andmetel:

- *2A. Grupp: ühendid (segud), mis on tõenäoliselt kantserogeensed inimesele.*
- *2B. Grupp: ühendid (segud), mis võivad olla kantserogeensed inimesele.*

3. Grupp: ühendid (segud või kokkupuude), mille kantserogeenne toime inimesele pole teada. Seda kategooriat kasutatakse segude, ainete ja kokkupuute tingimuste puhul, kus puuduvad adekvaatsed tõendid kantserogeensuse kohta inimestele ja katseloomade puhul puuduvad või on puudulikud (piiratud). Erandina kuuluvad siia ka ühendid, kus inimesele kantserogeensus on adekvaatselt kindlaks tegemata, kuid sealjuures katseloomadel on piisavalt andmeid kantserogeensuse esinemise kohta. Juhul, kui on piisavalt tõendeid kantserogeensuse mehhanismi mitte töötamises inimestes. Need, mis ei kuulu ühtegi teise gruppi, pannakse siia.

4. Grupp: ühendid (segud), mis tõenäoliselt pole kantserogeensed inimesele. Esineb piisavalt palju andmeid kantserogeensuse puudumise kohta inimestele ja loomadele. Mõnel juhul võib siia alla haarata ka aineid, segusid ja kokkupuute tingimusi, kus on ebapiisavad tõendid kantserogeensuse kohta inimesele, kuid samas on ulatuslikult tõendit selle kohta, mis viitavad kantserogeensuse puudumisele katseloomadel [6].

1.3. Miks Sudaanid on ohtlikud?

Nagu eelpool öeldud kuuluvad Sudaan I, II, III ja IV IARC järgi 3. grupi kantserogeenide hulka. Nimetatud gruppi loetakse ühendeid, mille kantserogeenne toime inimesele pole selge [6].

Peale manustamist/tarbimist võivad asovärvid Sudaan I, II, III ja Sarlakpunane (Sudaan IV) redutseeruda vastavateks amiinideks.

Järgnevalt antakse ülevaade töös käsitletavate Sudaan tüüpi värvainete põhilistest laguproduktidest inimorganismis (vt joonis 1).

Sudaan I

Redutseerumise käigus võivad tekkida amiinid: aniliin ja 1-amino-2-naftool. Aniliin on klassifitseeritud 3. grupi kantserogeeniks. Lisaks sellele on ta toksiline, kahjulik ja ohtlik keskkonnale. 1-amino-2-naftool kohta andmed puuduvad.

Sudaan II

Redutseerumisel tekivad amiinid: 2,4-dimetüülbenseenamiin ja 1-amino-2-naftool. 2,4-dimetüülbenseenamiini klassifitseeritakse 3. grupi kantserogeeniks.

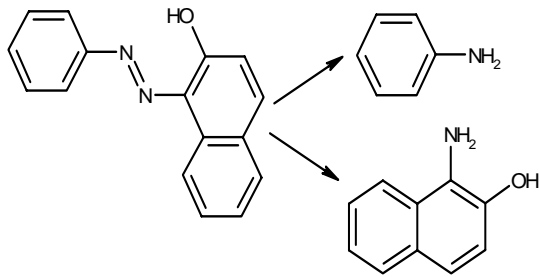
Sudaan III

Redutseerumisel tekivad amiinid: 4-aminoasobenseen; 1-((4-aminofenüül)aso)-2-naftool; aniliin; p-fenüüldiamiin ja 1-amino-2-naftool. 4-aminoasobenseen on 2. grupi kantserogeen ning on ka ohtlik keskkonnale. p-fenüüldiamiin on toksiline, ärritav ja ohtlik keskkonnale. 1-amino-2-naftooli ja 1-((4-aminofenüül)aso)-2-naftool kohta vastavad andmed puuduvad.

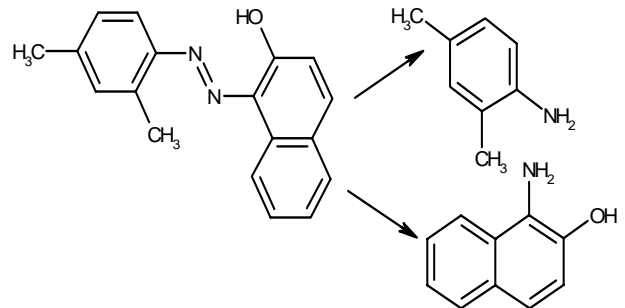
Sudaan IV

Redutseerumisel tekivad amiinid: o-aminoasotolueen; 1-((4-amino-2-metüülfenüül)aso)-2-naftool; 1-amino-2-naftool; 2,5-diaminotolueen ja o-toluidiin. o-aminoasotolueeni loetakse 2. grupi kantserogeeniks. o-toluidiin kuulub ka 2. grupi kantserogeenide hulka. Peale selle on ta ka toksiline, ärritava toimega ja ohtlik keskkonnale. 2,5-diaminotolueen on toksiline, ärritava toimega ja ohtlik keskkonnale. 1-((4-amino-2-metüülfenüül)aso)-2-naftool kohta andmed puuduvad [7].

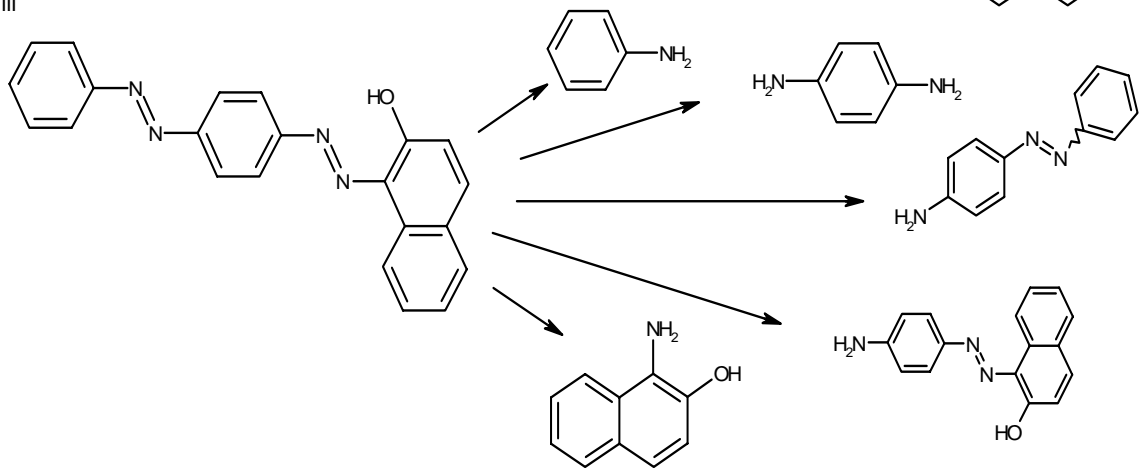
Sudaan I



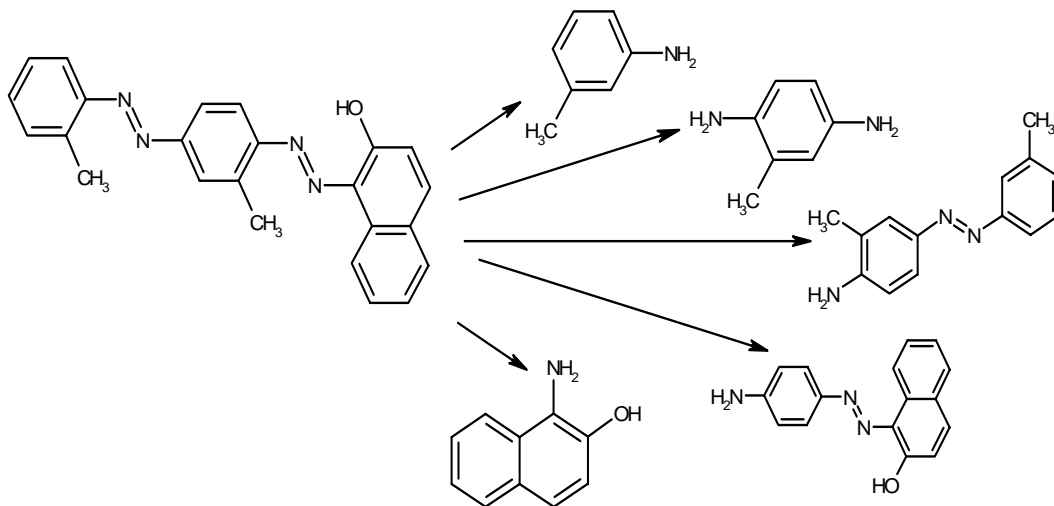
Sudaan II



Sudaan III



Sudaan IV



Joonis 1. Sudaan I – IV ja nende laguproduktid.

1.4. Kuidas satuvad Sudaanid tootesse?

Sudaanid võivad toidu sisse sattuda tahtlikult (võltsimine) või juhuslikult (rikutud maitseaine kasutamise tõttu või tootmistehnoloogiast).

Tahtlikult satuvad Sudaanid toidu sisse, kui neid on lisatud värvuse parandamise eesmärgil. Sageli tootmise käigus kaob toote loomulik punane värvus, mida siis kompenseeritakse värvainete lisamisega (viimasel ajal on peale muude värvainete kasutama hakatud Sudaan I – IV). Samuti võltsitakse tahtlikult kalleid tooteid raha teenimise eesmärgil [8].

Tootmise käigus:

- 1) maitseaine kuivatamisel kasutatud kottide värvist.

Näiteks paprikapulbrist on leitud jälgedena Sudaan IV (10 – 20 µg/kg). Tootjat kontrolliti, kuid ei leitud rikkumist. Kontrolliti ka punaseid kotte ning leiti, et need kotid sisaldavad väikeses koguses Sudaan I ja Sudaan IV. Järelikult punast värvi kottide kasutamisest paprika kaunade kuivatamisel, transportimisel ja hoidmisel, on tingitud Sudaanide esinemine tootes jälgedena.

- 2) presside õlitamiseks kasutatud masinaõlist (masinaõli on värvitud Sudaaniga).

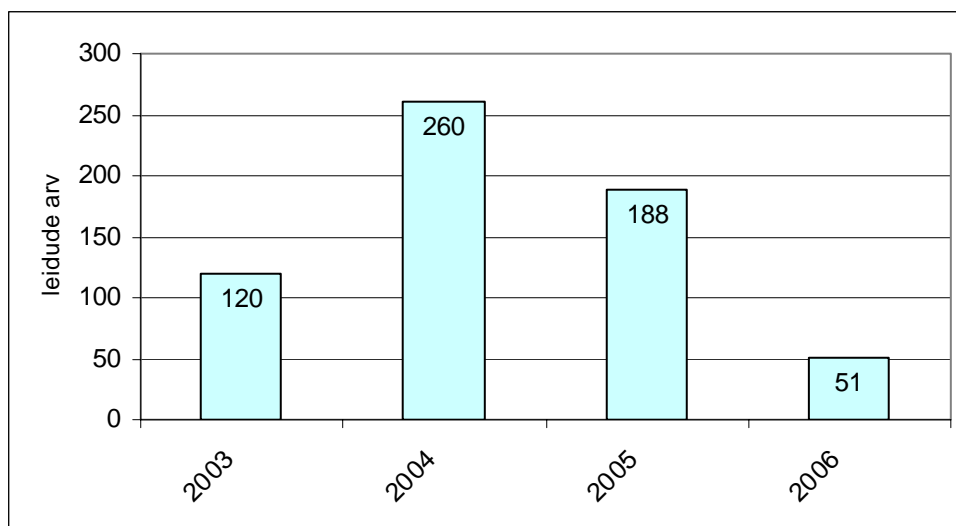
Näiteks oleoresiinis ehk paprika õlis on leitud jälgedena Sudaan I (10 – 200 µg/kg). Tootjat kontrolliti, kuid ei leitud rikkumist. Masinaõli kontrollimisel selgus, et see sisaldab väikeses koguses Sudaan I. Järelikult satub see tootesse õli tootmiseseadmete määrimiseks kasutatud punast värvi masinaõlist [9].

Kuna Sudaan I – IV kasutamine toidus on inimese tervisele ohtlik, siis vastavalt Euroopa Liidu Komisjoni otsusele 2005/402/EL (varasemad redaktsioonid 2003/406/EL ja 2004/92/EL) peab ühendusse imporditavatel inimtoiduks ettenähtud saadetistel, nagu vürtspaprika ja vürtspaprikatoodetel, kurkumal ja palmiõlil kaasas olema importija või toidukäitleja analüüsi aruanne, mis tõendab, et saadeti ei sisalda Sudaan I – IV [1].

Järgnevas peatükis antakse ülevaade sellest, kui palju on esinenud rikkumisi Sudaan I – IV kasutamisel ning sellest, kust seda on leitud.

1.5. Sudaanide leiud

RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) andmetel leiti esmakordselt 2003 aastal Prantsusmaal Sudaan I Indiast pärit tšillipulbrist. RASFF andmetele tuginedes oli teateid Sudaan I – IV leiu kohta toidus 2004 aastal (260 teadet) kõige rohkem võrreldes 2003 (160 teadet), 2005 (188 teadet) ja 2006 (51 teadet) aastaga (joonis 2) [10].

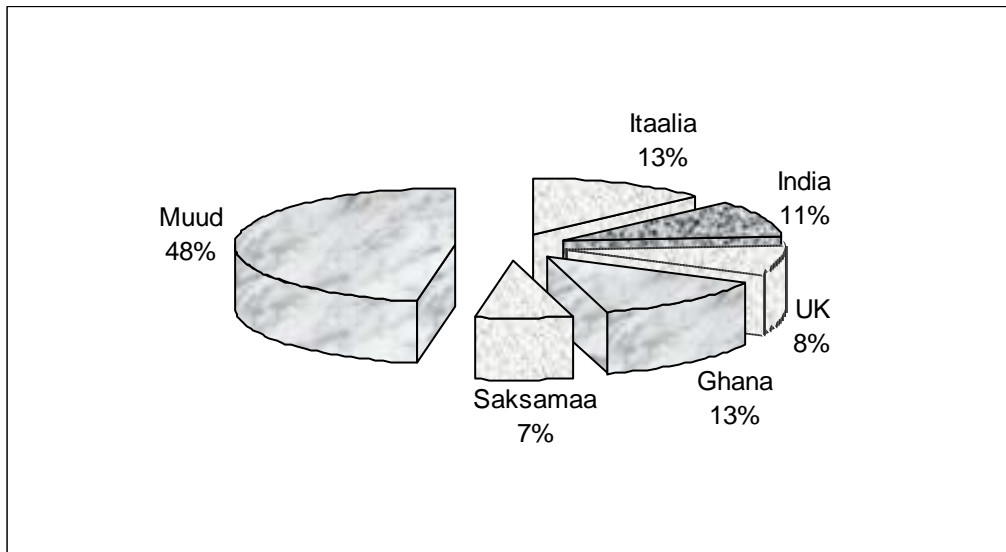


Joonis 2. Sudaanide leiud aastatel 2003 – 2006.

Nagu näha on keelatud värvainete Sudaan I – IV leidumine toidus aastate lõikes vähenenud, kuna on saavutatud Euroopa Liidus järelvalve/kontroll. Sudaanide leidumist tšillipulbris ja tšillit sisaldavates toodetes on hakatud kontrollima ning positiivse tulemusega proovid kõrvaldatakse turult.

Võib öelda, et RASFF andmete põhjal on hakatud Sudaane kasutama peale maitseainete ja kastmete ka palmiõlides ning pastatoodetes. Esmakordselt leiti Sudaane pastatoodetes 2003 aastal ja palmiõlis 2004 aastal. Siinjuures võib nentida, et enim kasutatud värvained sellest grupist on Sudaan I ja Sarlakpunane (Sudaan IV).

Riike, kust pärinevad tooted, millest on leitud Sudaan I – IV on palju. Enamasti pärinevad võltsitud tooted Indiast, Itaaliast ja ka teistest riikidest (joonis 3).



Joonis 3. Sudaan I – IV sisaldavate toodete päritolumaade osakaal protsendiliselt.

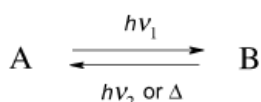
1.6. Tasakaalud Sudaanide lahustes

Asovärvides, nagu Sudaanid on võimalik 3 tüüpi tasakaalu esinemist:

1. valgusest tingitud E-Z-isomerisatsioon;
2. aso-hüdrasoon prototroopne tautomeeria;
3. pöördisomeeria ehk rotatsiooni-isomeeria

E- ja Z-Sudaanid

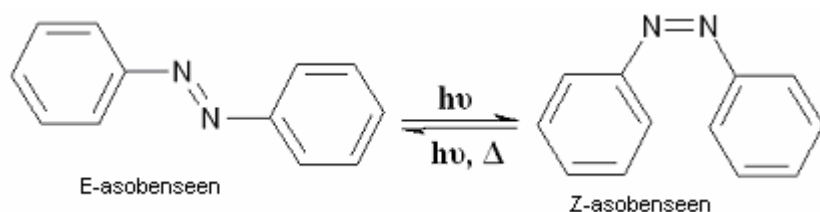
Sudaanide isomerisatsiooni puhul tuleb rääkida sellisest mõistest nagu fotokromism. See on keemiliste ühendite muundumine ühest vormist teise, kusjuures vähemalt ühes suunas toimub üleminek elektromagnetilise kiirguse toimel (joonis 4). Ühendid A ja B peavad omama erinevat neeldumisspektrit.



Joonis 4. Ühendi A üleminek vormi B

Joonise 4 kohaselt, muutub termodünaamiliselt stabiilsem vorm A kiirguse toimel vormiks B. Tagasi muundumine vormi A võib toimuda termiliselt või fotokeemiliselt.

Sudaanid on analoogsed asobenseenile (joonis 5). Asobenseen on tuntud oma fotokroomse iseloomu poolest. UV valguse toimel E-asobenseen isomeriseerub Z-asobenseeniks. Valguse puudumisel Z-vorm (cis-vorm) pöördub termiliselt tagasi termodünaamiliselt stabiilsemasse E-vormi (trans-vormi) [11-13].



Joonis 5. Asobenseen ja tema E-Z isomeerid

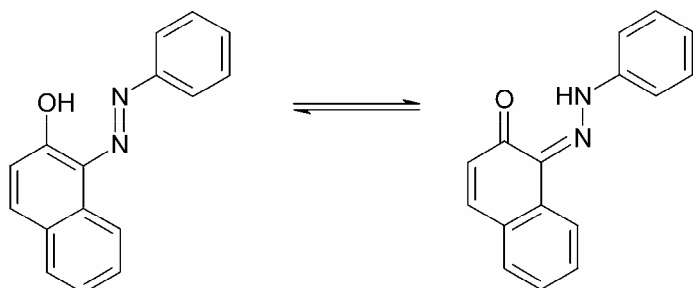
Asobenseeni E isomeer on planaarne, samas kui Z ei ole. Kirjanduses toodud CNNC kahetahuline nurk on röntgen-struktuuranalüüsi andmetel 8° [14] ja teoreetiliste arvutuste põhjal $12,0^\circ$ [14] ning $2,4^\circ$ [19]. E ja Z isomeeridel on ka erinev UV/Vis spekter. Suurema

lainepikkusega absorptsiooni maksimumi ($n \rightarrow \pi^*$) intensiivsus on palju madalam E-asobenseenil ($\epsilon_{449} = 405 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) võrreldes Z-vormiga ($\epsilon_{440} = 1250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Madala lainepikkusega absorptsiooni maksimum ($\pi \rightarrow \pi^*$) asub Z-vormi puhul tunduvalt väiksemal lainepikkusel (274 nm) võrreldes E-vormiga (316 nm) [12].

Põhimõtteliselt võivad Sudaan I ja II eksisteerida, sarnaselt asobenseeniga, E- ja Z-vormis, Sudaan III ja IV isegi EE, EZ, ZE ning ZZ vormis. Samas 2-hüdroksü rühm võib moodustada molekulisese vesiniksideme, stabiliseerides sellega trans-vormi.

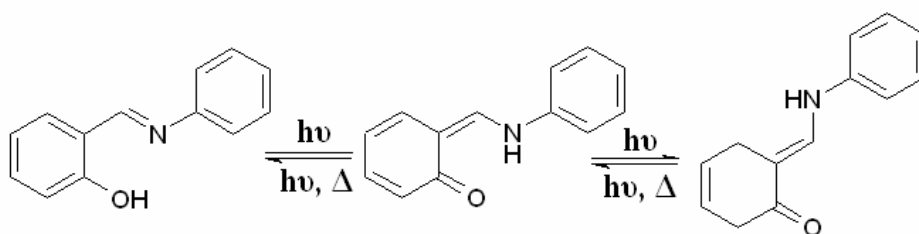
Aso-hüdrasoon tautomeeria

Sudaanides on võimalik ka prototroopne tautomeeria (joonis 6), mida sarnaste ühendite puhul nimetatakse ka aso-hüdrasoon tautomeeria, samas ei ole see võimalik asobenseenis [11,12,15].



Joonis 6. Aso-hüdrasoon tautomeeria Sudan I [15]

Kui prootoni ülekandeks on vajalik UV/Vis kiirguse olemasolu, siis on tegu fotokroomse protsessiga, nagu on leitud aniilides (joonis 7) [16].



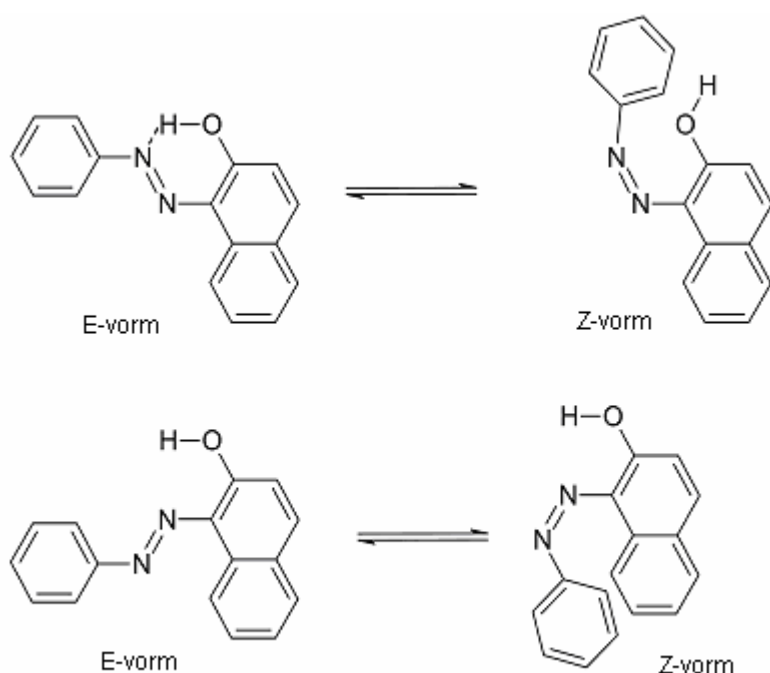
Joonis 7. Prootoni ülekanne aniilis (2-hüdroksü- N- fenüülbensaldimiin)

Sudaan I puhul on põhjalikult uuritud aso-hüdrasoon tautomeeriat nii eksperimentaalselt kui ka teoreetiliselt [15,17]. Sudaan III jaoks leidub kirjanduses vaid teoreetiliselt arvutatud

tulemusi [18]. UV/Vis spektrite analüüsil on leitud, et aso-hüdrasoon tasakaalu konstandi (K_H) suurus sõltub solvendist. Samas ei ole leitud mingit korrelatsiooni tuntud solvendi polaarsust kirjeldavate parameetrite ning K_H vahel [15]. Antonovi [19] uurimuse kohaselt on hüdrasooni vormi fraktsioonide suurused i-oktaanis 33,1% ja kloroformis 59,5 % ja formamiidis 73,8 %.

Rotameerid

Erinevalt asobenseenist on Sudaanid I – IV ebasümmeetrilised. E- ja Z-Sudaan I võivad esineda kahes vormis (joonis 8). Need tekivad naftoolrühma pöörlemisel ümber N-C sideme. Tänu o-metüül rühmale võib Sudaan II olla veel rohkem konfiguratsioone. Sudaan III ja IV puhul on situatsioon veelgi keerulisem.



Joonis 8. Sudaan I võimalikud rotatsiooni vormid ja nende E-Z isomeerid

Kromatograafiliselt on võimalik toatemperatuuril eraldada ainult E- ja Z-vormid, tänu kõrgele energiabarjäärile. Samadel tingimustel arvatavasti on vesiniku ülekande liialt kiire, et tautomeere kromatograafiliselt lahutada. Kuid võib olla võimalik neid eraldada, kui temperatuur viia väga madalale [16].

1.7. Määramismeetodid

Kirjanduses leidub mitmeid meetodeid Sudaanide määramiseks toidus. Näiteks nende määramisel kasutatakse HPLC-d UV/Vis [3, 20, 21] või MS detekteerimisega [22 - 25]. Sudaan I – IV analüüsil leiab kasutust ka elektroforees [26], millele järgneb UV detekteerimine ning kasutatakse ka vedelikkromatograafilist analüüsi, millele järgneb kemoluminisents detekteerimine [27]. Samuti leidub ka meetod, kus viiakse läbi Soxtec ekstraheerimist, millele järgneb GPC puhastus [28]. Poolkvantitatiivse meetodina kasutatakse õhukesekihi kromatograafiat (TLC) [29]. Järgnevalt vaadeldakse kirjanduses esinevaid meetodeid.

Paljude vedelikkromatograafiliste meetodite puhul määratakse ainult Sudaan I [20, 21, 23, 27] ja ka mõnede meetodite korral analüüsitakse Sudaan I, II, III ning IV [3, 22, 23]. Detekteerimisel kasutatakse enamasti UV/Vis või mass selektiivset detektorit (tabel 2).

Proovi ettevalmistuse seisukohalt võiks välja tuua seda, et enamasti kasutatakse lihtsalt solvendiga ekstraheerimist. Tavaliselt ekstraheerimisel kasutatakse solvendina atsetooni, atsetonitriili, metanooli ja etanooli (tabel 2). Puuduseks ekstraheerimisel võib välja tuua selle, et ekstraheeritakse üks kord suure kogusega, kuid ei tõestata ühekordse ekstraheerimise piisavust.

Töös [28] kasutatakse Soxtec ekstraktsiooni, millele järgneb geeliga puhastamine. Selline tegutsemine annab puhtamad proovid, kuid samas on väga aeganõudev.

Euroopa Liidu poolt on kehtestatud ka HPLC analüüsile LoD (0,5 kuni 1,0 mg/kg), mille peab olema suuteline tagama iga vastavat analüüsi läbi viiv labor [30].

Tabel 2. Ülevaade kromatograafilistest meetoditest

Viide	Analüüt	Kolonn	Süsti suurus μl	Detektor	Linepikkus nm	Eluent	Proovi ettevalmistus	Maatriks	LOD	LOQ
[3]	Sudaan I-IV	Varian Microsorb-MV (150 x4,6 mm, 5 μm)	–	PDA	Sudaan I- 478 Sudaan II- 496 Sudaan III- 510 Sudaan IV- 520	Atseetonitriil/vesi (80/20)	Atseetonitriiliga ekstraheerimine Proovi lõpplahus atseetonitriilis	Tšilli-, karrikastmed ja maitseained	Kaste: 0,2-0,5 mg/kg; Maitseaine: 1,5-2 mg/kg	Kaste: 0,4-1 mg/kg; Maitseaine: 3-4 mg/kg
[22]	Sudaan I-IV	Luna C18 (250x2,1 mm, 5 μm)	20	MS/MS	–	0,1% sipelghapet metanoolis/0,1% sipelghapet vees(97/3)	Ekstraheerimine atsetooniga. Proovi lõpplahus atsetoon/vesi	Tšilli tooted	Kaste: 5-17 $\mu\text{g/kg}$	Kaste: 7-48 $\mu\text{g/kg}$
[24]	Sudaan I-IV	Symmetry C18 (0,32x150mm, 5 μm)	10	MS/MS	–	Gradient: A) 0,1% sipelghapet vees/atseetonitriil (85/15), B) 0,1% sipelghapet atseetonitriilis/atseton (80/20)	Ekstraheerimine atsetooniga. Proovi lõpplahus atsetoon/vesi.	Tšilli tooted	0,4-1,1 $\mu\text{g/g}$	–
[25]	Sudaan I-IV	Spherigel C18 (4,6x250mm, 5 μm)	20	MS	–	Gradient: A)20 mMammooniumatsetaat+1 % äädikhapet; B) metanool	Ekstraheerimine DMSO-ga. Proovi lõpplahus DMSO.	Tšillit sisaldavad maitseained	0,01-4 ng	0,03-11,2 ng
[23]	Sudaan I	RP-Amide C16 (4,6x250 mm, 5 μm)	20	DAD, MS	481	Gradient. A) atseetonitriil; B) metanool	Ekstraheerimine 96 % etanooliga. Proovi lõpplahus etanoolis.	Maitseained ja muu.	60 $\mu\text{g/kg}$	180 $\mu\text{g/kg}$
[28]	Sudaan I	Chromsep RP-C18 (150x4,6 mm, 5 μm)	20	MS	–	Gradient: vesi-atseetonitriil	Soxtec ekstraheerimine ja geelpuhastus. Proovi lõpplahus atseetonitriilis.	Tšillipulber ja tšillit sisaldavad tooted	7 $\mu\text{g/kg}$	13 $\mu\text{g/kg}$
[20]	Sudaan I	Vydac 201 TP54 (250x4,6 mm)	15	DAD	476	4 osa atseetonitriili 1 osa 0,05 M ammooniumatsetaati metanoolis	Ekstraheerimine tööstusliku piiritusega. Proovi lõpplahus tööstuslikus piirituses.	Tšilli tooted	–	–
[21]	Sudaan I	Waters Spherisorb ODS (4,6 x150 mm)	20	DAD	480	A: 0,6804 g NaH_2PO_4 400 ml vees B: 2,0240 g tereabutüülammooniumbromiidi 1600 ml metanoolis	Ekstraheerimine metanooliga. Proovi lõpplahus metanoolis.	Tšilli tooted	–	–

1.8. Meetodi valik

Meetodi valikul lähtuti mitmetest kriteeriumitest:

1. meetod peab olema lihtne;
2. meetod peab olema sobilik rutiinanalüüsiks;
3. meetod peab võimaldama analüüsida võimalikult palju maatrikseid;
4. meetod peab võimalikult täpselt kinnitada Sudaan I – IV leidumist (st. välistama valepositiivse tulemuse)

Meetodi valikul tuli arvestada olemasolevate instrumentidega ja kuna praktikas hakatakse seda meetodikat kasutama TKI Tartu Laboris, siis analüüsi tuleb läbi viia HPLC-ga ning detekteerimiseks kasutada UV/Vis detektorit.

Nagu eespool mainitud kasutatakse Sudaan I – IV määramiseks erinevaid meetodeid (vt peatükk 1.7), kuid meie valiku puhul sai määravaks proovi ettevalmistuse lihtsus ja suhteline odavus. Eespool mainitud kriteeriumitele vastab solvendiga ekstraheerimine. Vale positiivset tulemust välistamiseks saab registreerida UV/Vis detektoriga proovist täisspektri.

Lenduva eluendi valikul osutus määravaks see, et paralleelset viidi meetodi välja töötamist läbi Tartu Ülikooli Katsekoja LC/MS masinal. Lisaks hõlbustab ka vajadusel see kiiresti üle minna LC/MS-le ka TKI Tartu Laboris.

Proovi ekstarraheerimisel kasutatakse atsetooni, kuna katsetuste põhjal osutus see kõige sobivamaks ning see on ka tuntud ekstraheerimis solvent.

1.9. Meetodi valideerimine

ISO definitsiooni kohaselt [31] nimetatakse valideerimiseks:

- 1) Protsessi, mille käigus tehakse kindlaks meetodi karakteristikud ja piirangud ning samastatakse mõjudega, mis võivad neid muuta ja kui palju.
- 2) Protsess, mis tõestab meetodi sobivust eesmärgiga.

Võimalikud parameetrid, mida kontrollimiseks kasutatakse on selektiivsus, spetsiifilisus, määramatus, määramis- ja avastamispiir, lineaarsus, täpsus, õigsus, tundlikkus, kapriissus ja saagis.

Järgnevalt vaadeldakse eespool nimetatud parameetreid lähemalt.

Selektiivsus

Selektiivsuseks (selectivity) nimetatakse meetodi võimet mõõta täpselt ja spetsiifiliselt analüüti ning mitte olla mõjutatud teiste ainete sisaldusest proovi maatriksis. *Spetsiifilisuseks (specifity)* nimetatakse 100 % -st selektiivsust.

Avastamis- ja määramispiir

Avastamispiir (limit of detection, LoD) on selline kontsentratsioon, millest alates on võimalik tuvastada määratava komponendi esinemist proovis, seetähendab annab mõõtetulemuse, mis märgatavalt erineb nullproovi väärtusest.

Määramispiir (limit of quanditation, LoQ) on selline kontsentratsioon, mida on võimalik etteantud täpsusega määrata. Alates sellest piirist on õigustatud kvantitatiivse analüüsi tulemuse numbriline esitamine.

Kvantitatiivseks kindlakstegemiseks arvutatakse ruuthälve sellise proovi paralleelmääramiste tulemustest, mis määratavat ühendit ei sisalda või sisaldab seda minimaalselt. Praktikas valitakse selleks analüüsitava prooviga sarnane maatriks.

Avastamispiiri arvutamiseks kasutatakse järgnevat valemit

$$LoD = 0 + 3 * S(c) \quad (1)$$

ja määramispiiri arvutamiseks valemit

$$LoQ = 0 + 10 * S(c) . \quad (2)$$

Kus $S(c)$ on lisamiskatsetest saadud kontsentratsiooni standardhälve.

Mõõtemääramatus

Mõõtemääramatus ehk *määramatus* (*uncertainty*) on parameeter, mis on seotud mõõtetulemusega ning iseloomustab analüüsitulemustele omistatavate võimalike väärtuste hajusust.

Lineaarsus

Lineaarsuseks (*linearity*) nimetatakse meetodi võimet anda testi tulemuste proportsionaalset ehk võrdelist sõltuvust analüüdi kontsentratsioonist.

Täpsus

Täpsuseks (*accuracy*) nim. testi tulemuse ja tunnustatud referentsväärtuse kokkulangevust. *Täpsus* (*precision*) näitab seda, kui hästi langevad üksteisega kokku mõõtetulemused.

Õigsus

Õigsus (*trueness*) on omadus anda tulemusi, mis on lähedased tõelisele väärtusele. Iseloomustamiseks kasutatakse viga.

Tundlikkus

Tundlikkus (*sensitivity*) iseloomustab analüütilise signaali muutuse ulatust antud analüüdi sisalduse muutusest tulenevalt. Kvantitatiivse iseloomustajana kasutatakse kalibreerimisgraafiku tõusu.

Kapriissus

Kapriissus (*ruggedness*) iseloomustab saadavate tulemuste tundlikkust parameetrite (nt. voolukiiruse, kolonni temperatuuri, detekteerimise lainepikkuse, süsti suuruse) väikeste muutuste suhtes.

Saagis

Saagis (*recovery*) iseloomustab meetodi võimet määrata kogu proovis sisalduvat analüüti. Tavaliselt väljendatakse tulemust protsentides. Saagis arvutatakse järgnevalt:

$$\%R = [(CF - CU) / CA] * 100, \quad (3)$$

kus CF on rikastatud proovis mõõdetud kontsentratsioon; CU on analüüdi kontsentratsioon rikastamata proovis ja CA on juurde lisatud analüüdi kontsentratsioon [31].

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

Eksperimentaalne osa viidi läbi TKI Tartu Laboris ja Tartu Ülikooli Katsekojas. Alljärgnevalt tuuakse välja TKI-s ja KK-s kasutatud aparatuur ja reaktiivid.

2.1. Aparatuur

2.1.1. TKI Tartu Labor

Üldised vahendid:

- Kaal: Mettler Toledo AG 245
- Proovide purustamiseks /homogeniseerimiseks saumikser ning veski
- Rotaatorauruti
- Tsentrifuug (pöõretearv 1500 p/min)
- Tsentrifuugiklaasid (15 ml)
- 100 ml ümarkolvid
- 100 ml Erlenmeyeri kolvid
- 10 ml pipetid
- Süstalfiltrid Millipore Millex®-LCR (hüdrofiilsed, PTFE, 13 mm, 0,45 µm)
- Pre-Cut membraanid eluendi filtreerimiseks (Nailon, 47 mm, poorisuurusega 0,2 µm, Alltech)
- Vaakumfiltratsiooniseade (Alltech)

Hewlett Packard 1100 HPLC süsteem:

- Solvendipudelite alus
- Kvaternaarpump G1311A;
- Vaakumdegasaator G1322A;
- DAD G1315A;
- Kolonnitermostaat G1316A ja
- Automaatdosaator (ALS) G1313A.

Andmeid töödeldi ja analüüsiti programmiga HP ChemStation 1100 ver. A06.03.

Analüütilise kolonnina kasutati Waters Spherisorb ODS2 (C18) *endcapped* kolonni pikkusega 250 mm, diameetriga 4,6 mm ja osakese suurusega 5 µm. Eelkolonni C18 osakese suurusega 5 µm.

2.1.2. Tartu Ülikooli KK

Üldised abivahendid:

- Kaal: Startorius LA230S (Startorius AG Saksamaa)
- Proovide purustamiseks /homogeniseerimiseks 600 W Brown saumikser
- Rotaator Rotavapor RE120 typ. KRvr65/45 (Büch Šveits)
- 100 ml ümarkolvid
- 100 ml Erlenmeyeri kolvid
- 10 ml pipetid
- 10 ml tsentrifuugiklaasid
- Tsentrifuug (pöörete arv 2000 p/min)
- Süstalfiltrid Millipore Millex®-LCR (hüdrofiilsed, PTFE, 13 mm, 0,45 µm)
- Millipore membraanfilter (Durapore 0,45 µm) eluendi filtreerimiseks
- Vaakumfiltratsiooni seade: vaakumfiltratsiooni lehter GV 050/0 (250 ml); filtraadi pudel AS 003/02 (500 ml) (Sleicher & Schuell GmbH Saksamaa) ning pump KNF typ. N840FT.18 Laboport (KNF Neuberger GmbH Saksamaa)
- Veepuhastusseade Millipore Simplicity

LC-MS süsteem 1100 seeria (Agilent):

- Solvendipudelite alus
- Vaakumdegasaator G1379A
- Binaarne pump G1312A
- Automaatdosaator (ALS) G1313A
- Kolonni termostaat (COLCOM) G1316A
- DAD G1315B
- Ioonlõks-massispektromeeter LC/MSD Trap XCT
- Eelvaakumpump
- Lämmastikugeneraator
- Süstlapump Syringe Pump Model 100 (KDSSciendific)
- Aparaaadi juht- ja andmetöötlusprogrammid: Chem Station, LC/MSD Trap Software 5.2, Quant Analysis for LC/MSD Trap 1.6, Data Analysis for LC/MSD Trap 3.2

Analüütilise kolonnina kasutati Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonni pikkusega 250 mm, diameetriga 4,6 mm ja osakese suurusega 5 µm ning eelkolonni Eclipse XDB-C18 pikkusega 12,5 mm, diameetriga 4,6 mm ja osakese suurusega 5 µm.

2.1.3. Kromatografeerimise ja detekteerimise tingimused

2.1.3.1. TKI Tartu Labor

HPLC meetodi väljatöötamisel leiti, et Sudaan I – IV analüüsil sobivateks tingimusteks on järgmised tingimused:

- mobiilne faas atsetonitriil ja puhver (koostisega 1mM ammooniumatsetaat + 0,1% sipelghapet) pH 2,8.
- detekteeritakse lainepikkustel 480 nm (Sudaan I, II, ja III) ning 540 nm (Sudaan IV).
- kolonni temperatuur 30 °C
- mobiilse faasi voolukiirus 1,5 ml/min
- süsti suurus 20 µl
- gradientprogramm, mis on järgmine:

Tabel 3. TKI Tartu Laboris kasutatav gradiendi programm (C%- atsetonitriili ja D%- puhvri protsendiline sisaldus)

Nr	Aeg(min)	C%	D%	Voolukiirus (ml/min)
1	0.0	82	18	1.5
2	10.0	82	18	1.5
3	20.0	100	0	1.5
4	30.0	100	0	1.5

Süsteemi stabiliseerimise aeg enne järgmist süsti 5 minutit.

2.1.3.2. Tartu Ülikooli KK

Vedelikkromatograafilise meetodi väljatöötamisel leiti, et sobivateks tingimusteks Sudaan I – IV analüüsil on järgmised tingimused:

- mobiilne faas atsetonitriil ja puhver (koostisega 1mM ammooniumatsetaat + 0,1% sipelghapet) pH 2,8.
- detekteeritakse lainepikkustel 480 nm (Sudaan I, II ja III) ning 540 nm (Sudaan IV).
- kolonni temperatuur 30 °C
- mobiilse faasi voolukiirus 0,8 ml/min
- süsti suurus 20 µl

- gradientprogramm, mis on järgmine:

Tabel 4. Tartu Ülikooli KK kasutatav gradientprogramm (B%- atsetonitriili ja A%- puhvri protsendiline sisaldus)

Nr	Aeg(min)	B%	A%	Voolukiirus (ml/min)
1	0.0	82	18	0.8
2	10.0	82	18	0.8
3	20.0	100	0	0.8
4	33.0	100	0	0.8

Süsteemi stabiliseerumise aeg enne järgmist süsti 10 minutit.

Tartu Ülikooli KK valiti eelnevate kogemuste põhjal optimaalseks voolukiiruseks 0,8ml/min.

MS detekteerimine:

MS parameetrid optimeeriti kasutades süstalpumpa (vt lisa 1) ja üldised parameetrid pandi paika tuginedes varasematele kogemustele.

ESI allikas, mille parameetrid on

- siseneva pihustusgaasi (N₂) rõhk 10 psi
- kuivatusgaasi (N₂) temperatuur 350 °C ja voolukiirus 10 l/min

Ioonlõksu parameetrid:

- UltraScan režiimi skaneerimise kiirus 26000 (m/z)/s ja skaneerimise vahemik 100 – 700 m/z.
- ICC SmartTarget 100000
- heeliumi rõhk 0,37*10⁻³mbar

Tabelis 5 on kokku võetud MS ja MS² parameetrid.

Tabel 5. MS ja MS² parameetrid

Nimetus	Aken (min)	Kvaasi molekulaarioon (m/z) [M+H] ⁺	Fragmentioon (m/z)	Fragmentatsiooni potentsiaal (V)	Fragmentioonide määratlus (m/z)
Sudaan I	0 – 16.0	249	232	0.74	[M+H-OH] ⁺
Sudaan II	16.0 – 21.6	277	260	0.89	[M+H-OH] ⁺
Sudaan III	21.6 – 26.0	353	197	1.06	[M+H-C ₁₀ H ₆ ON] ⁺
Sudaan IV	26.0 – 33.0	381	224	1.26	[M+H-C ₁₀ H ₆ OHN] ⁺

2.2. Reaktiivid

2.2.1. TKI Tartu Labor

Töös kasutatavad reaktiivid peavad olema puhtusega HPLC grade või reaktiivi puhtusega. Proovide ekstraheerimisel kasutati atsetooni (Rathburn) ja standardlahuste valmistamiseks metanooli (J. T. Backer). Mobiilse faasi koostises kasutati atsetonitriili (Rathburn), ammooniumatsetaati (Riedel-de Haën, puriss), sipelghapet (Fluka, puriss. p.a, 50 %) ja deioniseeritud vett juhtivusega 0,5 µS/cm.

Sudaani standardid osteti Sigma-Aldrich' st. Standardained olid järgmiste värvaine sisaldustega:

- Sudaan I 97 %;
- Sudaan II 90 %;
- Sudaan III 95 % ja
- Sudaan IV 80 %.

2.2.2. Tartu Ülikool KK

Proovide ekstraheerimisel kasutati HPLC-grade atsetooni (Rathburn) ja standardlahuste valmistamiseks HPLC-grade metanooli (J. T. Backer). Mobiilse faasi koostises kasutati atsetonitriili, ammooniumatsetaati (Fluka, purity > 99 %) ja sipelghapet (Rhieden-de Haën, purity > 98 %). Kasutatud Sudaan I – IV standardlahused nagu TKI Tartu Laboris. Kasutatud vesi juhtivusega 18,2 MΩ*cm ja TOC < 5 ppb.

2.2.3. Lahuste valmistamine

Puhverlahuse kontsentradi (0,1 M ammooniumatsetaat + 10 % sipelghapet) valmistamine: 0,7708 g ammooniumatsetaati lahustatakse 100 ml-s mõõtkolvis deioniseeritud veega ja lisatakse 16,7 ml 50 % (Tartu Ülikooli KK korral 8,35 ml) sipelghapet. Peale lahustumist täidetakse kolb deioniseeritud veega märgini. pH ca. 2,8.

Puhverlahuse (1 mM ammooniumatsetaat + 0,1 % sipelghape) valmistamine: 100 ml puhverlahuse valmistamiseks mõõdetakse 1 ml puhverlahuse kontsentrati 100 ml-sse mõõtkolbi ja lahjendatakse deioniseeritud veega märgini.

Sudaan I, II, III ja IV põhilahusete valmistamine: Sudaan I ja II põhilahuse valmistamisel kaalutakse 0,1 g värvi (täpsusega 0,0001 g) ja lahustatakse 100 ml-s mõõtkolvis metanooliga ning peale lahustumist viiakse maht 100 ml metanooliga. Saadud lahuste kontsentratsioon on 1000 mg/l. Sudaan III ja IV põhilahuse valmistamiseks kaalutakse 0,05 g värvi (täpsusega 0,0001 g) ja lahustatakse 100 ml-s mõõtkolvis atsetooniga. Peale värvaine lahustumist viiakse maht atsetooniga 100 ml-ni. Põhilahuse kontsentratsioon on seega 500 mg/l.

Sudaan I – IV abilahuse valmistamine (10 mg/l): Mõõdetakse 25 ml-sse mõõtkolbi 0,25 ml Sudaan I ja II põhilahust ning 0,5 ml Sudaan III ja IV põhilahust ning täidetakse metanooliga märgini.

Sudaani kalibreerimisgraafiku koostamiseks valmistatakse standardlahused kontsentratsioonidega: 0,03125; 0,0625; 0,25; 2,0; 5,0 ja 10,0 mg/l metanoolis. Standardrea valmistamiseks kasutatakse 10,0 ml mõõtkolbe ja lahuse kogused, mida võetakse standardrea valmistamiseks on toodud tabelis 6. Standardlahuseid ja põhilahuseid säilivad ca. 6 kuud 4 °C juures.

Tabel 6. Sudaan I – IV standardrea valmistamine

C (mg/l)	Abilahuse hulk (ml)
0,03125	5,0 (0,0625 mg/l)
0,0625	2,5 (0,25 mg/l)
0,25	0,25
2,0	2,0
5,0	5,0
10,0	0

2.3. Proovi ettevalmistus

Sõltuvalt maatriksist valmistatakse analüüsiks proovid ette erinevalt. Antud töös vaadeldakse kahte erinevat maatriksit, mille ettevalmistused on järgnevad.

Maitseained

Kaalutakse 1,0 g homogeniseeritud proovi 100 ml-sse Erlenmeyeri kolbi, lisatakse 10 ml atsetooni ja loksutatakse 2 min. Peale loksutamist kantakse lahus üle 15 ml klaasist tsentrifuugiklaasi ning tsentrifuugitakse 10 min. Ekstraheerimist korratakse 2 korda 10 ml ja 1 kord 5 ml atsetooniga. Ekstraktid kogutakse kokku 100 ml ümarkolbi ning aurutatakse kuivaks rotaatoraurutil. Kuivjääk lahustatakse 10 ml eluendis (82 % atsetonitriili + 18 % puhverlahust). Kuivjääk koos eluendiga asetatakse 5 min ultrahelivanni. Saadud lahus filtreeritakse läbi süstalfiltri ja viiakse vedelikkromatograafi.

Rasvavabad ja väherasvased kastmed

Kaalutakse 5,0 g homogeniseeritud proovi 100 ml-sse Erlenmeyeri kolbi, lisatakse 10 ml atsetooni ja loksutatakse 2 min. Peale loksutamist kantakse lahus üle 15 ml klaasist tsentrifuugiklaasi ning tsentrifuugitakse 10 min. Ekstraheerimist korratakse veel 3 korda 10 ml ja 1 kord 5 ml atsetooniga. Ekstraktid kogutakse kokku 100 ml ümarkolbi ning aurutatakse kokku rotaatoraurutil. Jääk viiakse 10 ml mõõtkolbi ja täidetakse eluendiga määrgini (82 % atsetonitriili + 18 % lahjat puhvrit). Saadud lahust hoitakse 5 min ultrahelivannis. Peale seda lahus filtreeritakse läbi süstalfiltri ja viiakse vedelikkromatograafi.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. Meetodi väljatöötamine

3.1.1. Kromatograafiliste tingimuste välja töötamine

HPLC analüüsil leiavad kasutust mitmesugused eluendid (peatükk 1.7). Põhiliselt kasutatakse lenduvate komponentidega eluente, mille koostises on metanool, atsetonitriil ja ammooniumatsetaat, kuna enamikel juhtudel on kasutatud mass-spektromeetrilisi detektoreid.

Käesoleva töö vedelikkromatograafilise meetodi välja töötamisel oli eesmärgiks saada usaldusväärne ja kiire vedelikkromatograafiline meetod Sudaan I – IV määramiseks maitseaineseades ja kastmetes. Mobiilse faasina kasutati atsetonitriili ja ammooniumatsetaadi vesilahust, millele oli lisatud 0,1 % sipelghapet (pH 2,8).

HPLC meetodi välja töötamisel prooviti algul Sudaan I – IV lahutamiseks isokraatilist elueerimist, kuid see võttis liialt kaua aega. Seetõttu võeti kasutusele gradient elueerimine, et lühendada analüüsi aega. Meetodi väljatöötamisel varieeriti gradiendi algusprotsenti (87% atsetonitriili ja 13 % puhvrit ning 82 % atsetonitriili ja 18 % puhvrit) ja voolukiirust (1 ml/min, 1,5 ml/min). Leiti, et sobivaks gradiendi algkoostiseks on 82% atsetonitriili ja 18 % puhvrit ning voolukiiruseks 1,5 ml/min. Lõplik kasutatav gradient süsteem TKI Tartu Laboris ja Tartu Ülikooli KK on toodud peatükis 2.1.3. tabelis 3 ja 4. Mõlemal juhul kasutatakse kolonni temperatuuri 30 °C ja süsti suurus 20 µl.

Sudaan I – IV detekteerimisel kasutatakse detektorina DAD-i kui ka mass-selektiivseid detektoreid (peatükk 1.7). Antud juhul kasutame analüüsil nii DAD-i kui ka mass-selektiivset detektorit. DAD korral kasutatakse mõlemal juhul detekteerimiseks kahte lainepikkust 480 nm ja 540 nm. Sudaan I – III detekteeritakse lainepikkusel 480 nm ja Sudaan IV lainepikkusel 540 nm. Lainepikkuste valik tehti puhta aine neelduvusspektri põhjal.

Tartu Ülikooli KK kasutati lisaks DAD-le mass- selektiivset detektorit. Sudaan I – IV kvantiseerimine toimus DAD põhjal. Sudaan I – IV analüüsil kasutati ESI allikat, mille üldised parameetrid pandi paika vastavalt kasutatavale eluendile ning voolukiirusele. Parameetrid on järgmised: siseneva pihustusgaasi (N₂) rõhk 10 psi, kuivatusgaasi (N₂) temperatuur 350 °C ning voolu kiirus 10 l/min.

Ioonlõks töötas režiimis UltraScan, skaneerimisekiirus 26000(m/z)/s ja skaneerimisvahemik 100 – 700 m/z. Ioonide hulka kontrolliti ICC (Ion Charge Control) SmartTargetiga 100000 (see on empiiriline suurus, mis iseloomustab ühiklaengute hulka, mida süsteem üritab

rakus saavutada) ning määrati maksimaalne ionide kogumise ajaks 300 ms. Heeliumi rõhk ioonlõksus oli $0,37 \cdot 10^{-3}$ mbar.

Esmalt toimus iga analüüdi jaoks molekulaariooni ning sobiva fragmentatsiooniproducti valimine. Selleks kasutati Sudaan I – IV standardlahust kontsentratsiooniga 1 mg/l, mida infuseeriti süstlapumba abil (kiirus 0,3 ml/min), eluendi voolu kiirusega 0,8 ml/min. Leitakse piisava intensiivsusega produkt, mis on iseloomulik analüüdile.

Iga analüüdiga viidi läbi automaatne parameetrite optimeerimine, mille tulemused on toodud lisas 1.

Need on parameetrid, mis mõjutavad ionide jõudmist ionallikast massanalüsaatorisse ning lisaks ka fragmenteerumist iseloomustav potentsiaal.

3.1.2. Proovi ettevalmistuse väljatöötamine

Kirjanduses põhjal kasutatakse ekstraheerimisel mitmesuguseid solvante, nagu etanool [23], metanool [20, 21], DMSO [25], atsetonitriil [3] ja atsetoon [22, 24]. Ekstraheerimisel kasutati järgmisi solvante, nagu metanool, atsetonitriil ja atsetoon. Eelpool nimetatud solventide puhul võis täheldada erinevat käitumist proovidest Sudaan I – IV välja ekstraheerimisel. Metanooli korral tuli proovidest kaasa tahkeid lisandeid ning lõpplahuse pealepanekul tekkis kaks kihti, seetõttu metanool ei osutunud heaks solvendiks ekstraheerimisel. Atsetonitriili puhul tekkis proovilt lahusti ära aurutamisel vedeljääk, mis küll lõpplahuse peale panekul lahustus täielikult.

Siiski leiti, et parimaks solvendiks Sudaan I – IV ekstraheerimisel proovidest on atsetoon, kuna lahustuvus selles on parim võrreldes teiste solventidega, mis leiavad kasutust Sudaan I – IV ekstraheerimisel. Ettevalmistuse käigus tehti kindlaks ka, et proovi tuleb ekstraheerida mitmeid kordi, enne kui kogu Sudaan I – IV on proovist välja ekstraheerunud. Leiti, et optimaalselt viie korraga ekstraheerub proovidest kogu Sudaan I – IV.

Sobiva lõpplahuse leidmiseks viidi läbi katse. Selleks lisati 2,0 g maitseainesegule 5 µg Sudaan I – IV ja ekstraheeriti 4 korda 10 ml atsetooniga. Seejärel mõõdeti pipetiga 4 ümarkolbi 10 ml saadud lahust ning aurutati kokku. Neljale proovi jäägile pandi peale 10 ml järgmisi lahuseid: atsetoon / atsetonitriil (50/50); puhver / atsetonitriil (18/82); atsetoon / atsetonitriil (25/75) ning puhver / atsetonitriil / atsetoon (18/41/41). Sama moodi toimiti ka tühiproovidega. Leiti, et sobivaimaks lõpplahuseks on puhver / atsetonitriil (18/82). Lõplik proovi ettevalmistus on kirjeldatud peatükis 2.3.

3.1.3. Kaksikpiigid Sudaanide analüüsi juures ja nende uurimine

Mõningatel kirjanduses leiduvatel Sudaan III ja Sudaan IV kromatogrammidel esineb lisapiik [32-34]. Publikatsioonis [33] on neid nõ. „kiireid“ lisapiike nimetatud mingiteks isomeerideks. Eksperimentide käigus nägime ka ise, et näiteks Sudaan III standardlahuse kromatogrammidel on kaks tunduvalt erineva retentsiooniajaga piiki (7,4 ja 18,4 min), sama ka Sudaan IV puhul (10,7 ja 33,7 min). Mõlemad piigid kuuluvad identsete molekulmassidega ühenditele, millede fragmentatsioonispektrid on väga sarnased samas, kui UV/Vis spekter ning polaarsus osutuvad tunduvalt erinevateks

Kaksikpiigi uurimisel kasutati Agilent eelkolonni (Eclipse XDB-C18, pikkusega 12,5 mm ja sisediameetriga 4,6 mm, osakeste suurusega 5 µm) ja isokraatiliselt elueerimist atsetonitriil/puhverlahus seguga 90/10.

Sudaan I – IV standardlahuse analüüsil esinesid UV/Vis kromatogrammil kõik kuus piiki (lisa 2). 10,2 min juures asuv piik on tingitud identifitseerimata lisandist. Sudaan I (249 m/z) ja II (277 m/z) EICidel oli üks piik samas kui Sudaan III (353 m/z) ja IV (381 m/z) andsid kaks piiki (lisa 3).

Võrreldes „kiire“ ja „aeglase“ piigi fragmentatsiooni massispektrit (MS^2) leiti, et need on mõlemal juhul sarnased (lisa 4). Samas lisa 5 toodud UV/Vis spektrid on erinevad. Sudaan I – IV kromatograafiline käitumine on kokku võetud lisa 6.

UV/Vis kromatogrammil (lisa 2) moodustab „kiire piik“ „aeglase“ piigi pindalast Sudaan III puhul 4,3 % ning Sudaan IV puhul 3,2 %, MS kromatogrammil vastavalt 19,2 ja 21,5 %. Kuna tootja garanteerib Sudaan III ja IV puhul suhteliselt madala puhtuse – vastavalt 95 % ja 80 % – siis on loogiline pidada „kiire“ piigi ühendit mõneks sünteesi kõrvalproduktiks. Näiteks asendi-isomeeria selgitaks kõiki tähelepanekuid: mahtuvusfaktori erinevust, sama mass-spektrit ning erinevat UV/Vis spektrit.

Järgnevad katsed kaksikpiikide uurimiseks viidi läbi Sudaan III-ga, Sudaan IV käitub sarnaselt.

Sudaan III „aeglane piik“ eraldati preparatiivselt kasutades C18 kolonni ning saadud lahus analüüsiti uuesti peale 25 min möödumist. „Kiire piik“ oli tekkinud uuesti, kuid väiksemana võrreldes varasemaga. Sama lahust süstiti veel 1 ja 2 tunni möödumisel. Selgus, et seisemisel „kiire piigi“ suhteline pindala „aeglase piigi“ pindala suhtes kasvas. Sellist käitumist saab selgitada mingi aeglase tasakaalulise protsessiga.

Järgnevad katsed viidi läbi hindamaks valguse mõju „kiire piigi“ ilmumisele. Täielikus pimeduses (isegi instrumendi valgus-diodid kaeti fooliumiga) eraldati preparatiivselt Sudaan

III “aeglane piik “. Saadud lahust analüüsides leiti, et Sudaan III “kiiret piiki” ei olnud tekkinud. Kui seda lahust järk-järgult intensiivsema valguse käes hoiti ning analüüsiti, siis selgus, et “kiire piik” tekkis taas ning “kiire piigi” pindala järjest kasvas, vastavalt valguse intensiivsusele (vt lisa 7).

“Aeglase piigi” ekstrakti hoiti intensiivse valguse käes ning tehti kindlaks „kiire piigi” olemasolu. Seejärel hoiti proovi ca. 3 tundi pimedas, millele järgnevalt proov analüüsiti ning selgus, et „kiiret piiki” ei olnud.

Eksperimendid kinnitasid, et “kiire piik” on “aeglase piigi” isomerisatsiooni produkt, mis tekib valguse toimel ning kaob valguse puudumisel.

Selle kontseptsiooni lisatõestuseks peatati mobiilse faasi liikumine, kui kromatograafiliselt eraldatud Sudaan III “kiire piik” jõudis detektorirakku. 7,5 minuti vältel registreeriti UV/Vis spektri muutus, mis on toodud lisa 8. Sarnane eksperiment viidi läbi ka “aeglase piigiga”. On ilmne, et UV/Vis spektri registreerimise ajal on detektori rakus valgus. Seega mõlemad eksperimendid peaksid andma identse U/Vis spektri – fotokroomsete isomeeride tasakaalulise segu spektri. Nagu näha lisa 8 muutub “kiire piigi” spekter oluliselt ja jääb konstantseks 2 minuti möödumisel.

“Aeglase piigi” spektri muutus pole nii ilmekas, kuna väikese koguse isomeeri olemasolu ei mõjuta piisavalt summaarset spektrit.

Eksperimendi tulemustele tuginedes võib järeldada, et „kiire piik” Sudaan III (ja Sudaan IV) kromatogrammidel on tingitud valguse poolt indutseeritud tasakaalulisest protsessist. Kuna kirjanduses puuduvad andmed sarnasest fotokroomsest aso-hüdrasoon tautomerismist või pöörd-isomerisatsioonist, siis hetkel loeme kiire piigi tekkepõhjuseks fotokroomset EZ-isomerismi.

Sudaan I ja II kromatograafilisel eraldamisel saadi üks piik, mille põhjal võib järeldada, et isomerisatsiooni ei toimu või on see liiga kiire protsess praegustel eksperimendi tingimustel. Sudaan I ja II E-vorm on stabiliseeritud sisemolekulaarse vesiniksidemega, mis võib inhibeerida EZ-isomerisatsiooni, või samas kiirendada vastupidist protsessi. Vaatamata põhjendusele võib oletada, et „kiire piigi” teke on põhjustatud Sudaan III (ja IV) teise asorühma poolt (kahe benseeni tuuma vahel).

3.1.4. Praktilised järeldused

Hindamaks lihtsate analüüsi tingimuste muutuste mõju tulemustele, registreeriti standardlahuse kromatogrammid kasutades läbipaistvaid, tumedaid ja fooliumiga kaetud viaale. See mudel käsitleb kolme tavalist juhtumit, kus kasutatakse a) läbipaistvaid viaale; b) tumedaid viaale ja päevast analüüsi; või c) öist analüüs (pimedas laboris). Kasutades eespool toodud võimalusi on oodatult kromatogrammidelt näha silmapaistvaid erinevusi (lisa 9). “Kiired piigid” on kadunud fooliumiga kaetud viaalide korral ning kõige suuremad kasutades läbipaistvaid viaale. Seega “aeglase piigi” pindala on maksimaalne fooliumiga kaetud viaale kasutades ehk analüüsides pimedas.

Hindamaks valguse mõju kvantitatiivsele analüüsile, koostati kaks kalibreerimisgraafikut Sudaan I – IV (0,03125; 0,0625; 0,25; 1; 2; 5 mg/l) pimedas ja tavalises laboratooriumi valguses. Valges kalibratsiooni korral kasutati läbipaistvaid viaale, mida hoiti automaatdosaatoris tund aega enne analüüsi algust. Teine eksperiment viidi läbi pimedas, kusjuures proovi viaalid olid kaetud fooliumiga ning neid hoiti pimedas ca. 4 tundi enne analüüsi algust. Saadud tulemuste põhjal koostati kalibreerimisgraafikud, mille andmed on esitatud lisa 10 ja graafik lisa 11.

UV/Vis puhul olid tulemused ootuspärased – Sudaan I ja II korral olid graafiku tõusud kokkulangevad (suhteline erinevus alla 1%), kuid Sudaan III ja IV korral oli tõusude suhteline erinevus vastavalt 10,6 ja 8,9 %. Massispektrometriga mõõdetud tulemustest jäeti kalibratsiooni graafikult välja 5 mg/l punkt, kuna see ei asunud enam lineaarses alas. Saadud kalibratsioonigraafikud ei näidanud ühtset tendentsi, kõige suurem suhteline tõusude erinevus (6,5 %) oli Sudaan I puhul.

Kalibratsiooni eksperiment lubab Sudaan III ja IV puhul arvutada “aeglase” ja “kiire” komponendi hulka. Pimedas saadud tulemused UV/Vis detektoriga loetakse tõeseks, selle põhjal on võimalik hinnata “kiire” komponendi osa valguses. Näiteks kontsentratsioonil 2 mg/l on Sudaan III ja IV pindalad valguses vastavalt 115,33 ja 104,21 mAU*s. Kui arvutada nende pindalade puhul kontsentratsioonid kasutades lisast 10 pimedas saadud kalibratsioonigraafikut, siis arvutatud kontsentratsioonid oleks vastavalt 1,79 ja 1,81 mg/l. See tähendab, et antud tingimustel on 89,7 % Sudaan III ja 90,6 % Sudaan IV termodünaamiliselt eelistatud E-vormis. Ülejäänud on fotokroomselt üle viidud Z- vormi.

Siinkohal tuleks rõhutada valguse mõju olulisust tulemuste õigsusele. Tabelis 7 on toodud pimedas ning valguses saadud kalibratsioonide alusel arvutatud kontsentratsioonid

hüpoteetilisele piigile pindalaga 140 mAU*s. Saadud tulemused näitavad, et ignoreerides valguse mõju tulemustele võib põhjustada üle 10 % suhtelise vea. Nagu on näha lisas 9 tuleb hoida lahuseid kuni süstimiseni pimedas. Kaubanduslike tumedate viaalide kasutamine ei lahenda probleemi täielikult.

Kui analüüsil kasutatakse HPLC-d UV/Vis detekteerimisega, siis võib esineda ka teistsugune viga. Näiteks, kui uuritav proov sisaldab Sudaan III ja analüüs viiakse läbi valguses, siis Sudaan III „kiire piik” võib elueeruda Sudaan I-ga sarnase retentsiooniajaga. Selle tulemusel võidakse anda vale-positiivne tulemus Sudaan I suhtes. Sarnaselt võidakse Sudaan IV „kiiret piiki” identifitseerida Sudaan II-na. Antud juhul ei aita ka täis spektri registreerimine, kuna intensiivsused võivad olla liiga väikesed hea UV/Vis spektri saamiseks. Samas võib valgusest tingitud piikide teke olla ka kasulik analüüsi seisukohalt, kuna see aitab kinnitada Sudaan III või IV leidumist proovis.

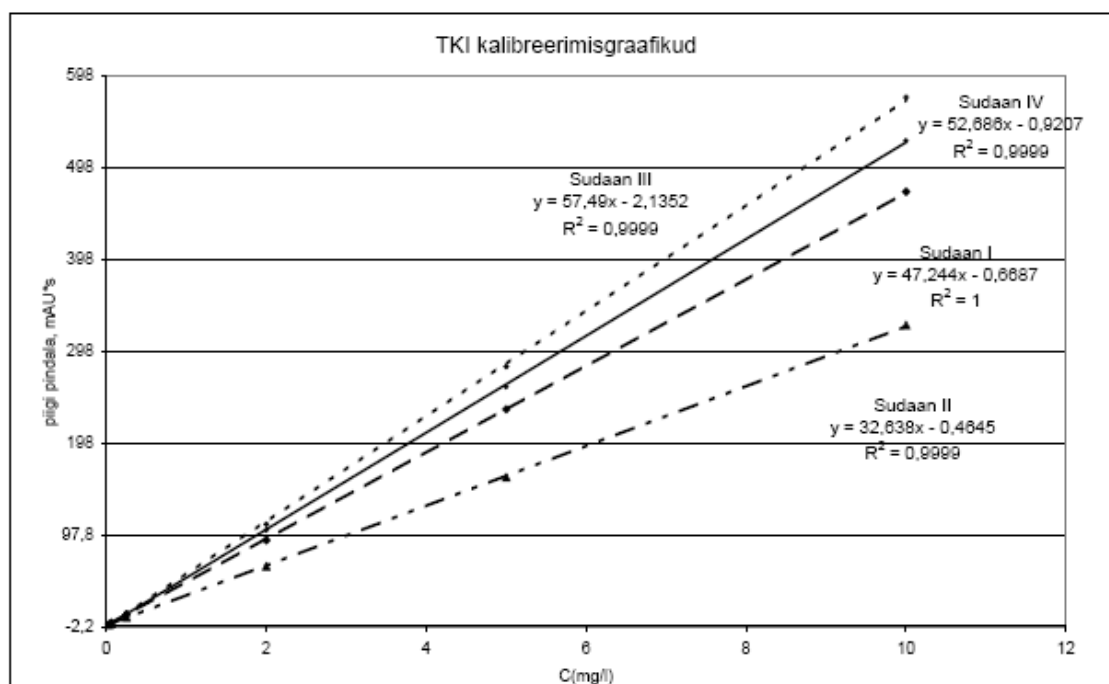
Tabel 7. Piigi pindalaga 140 mAU*s kontsentratsioonid (mg/l), mis on saadud kalibreerimisel pimedas ja normaalses valguses (UV/Vis kalibratsiooni andmed vt lisa 10).

	Sudaan I	Sudaan II	Sudaan III	Sudaan IV
Norm. valgus	2.60	4.66	2.43	2.24
Pimedas (tõeline kalibratsioon)	2.60	4.62	2.18	2.02
Suhteline viga	0.2 %	0.8 %	11.7 %	10.9 %

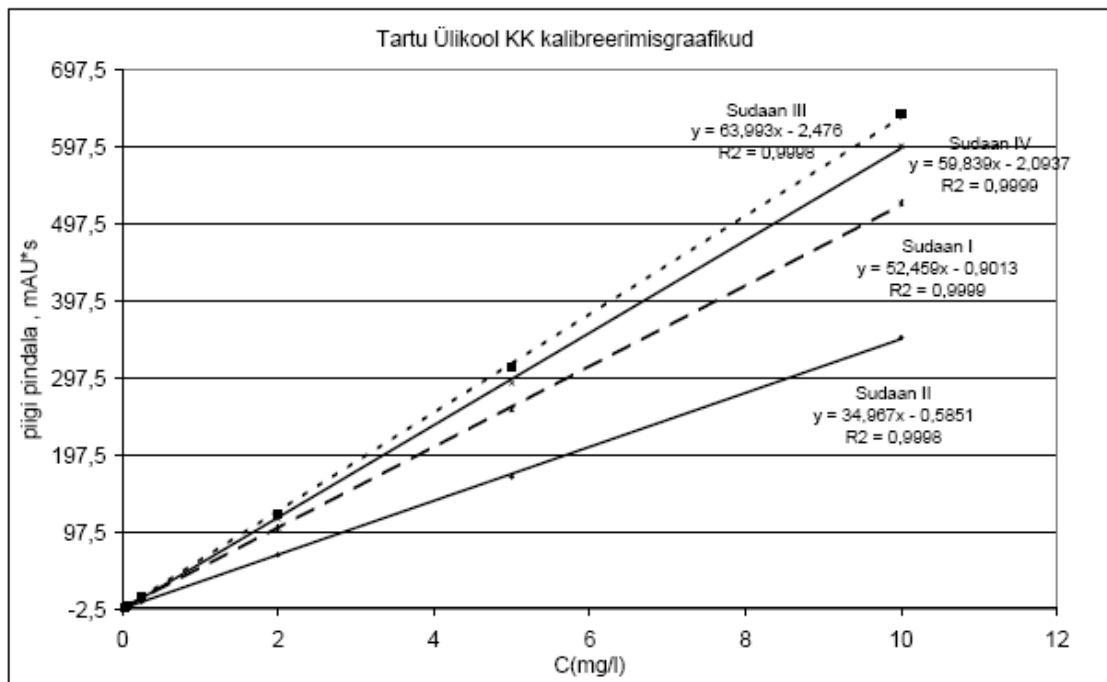
3.2. Analüüs

3.2.1. Kalibreerimisgraafiku koostamine

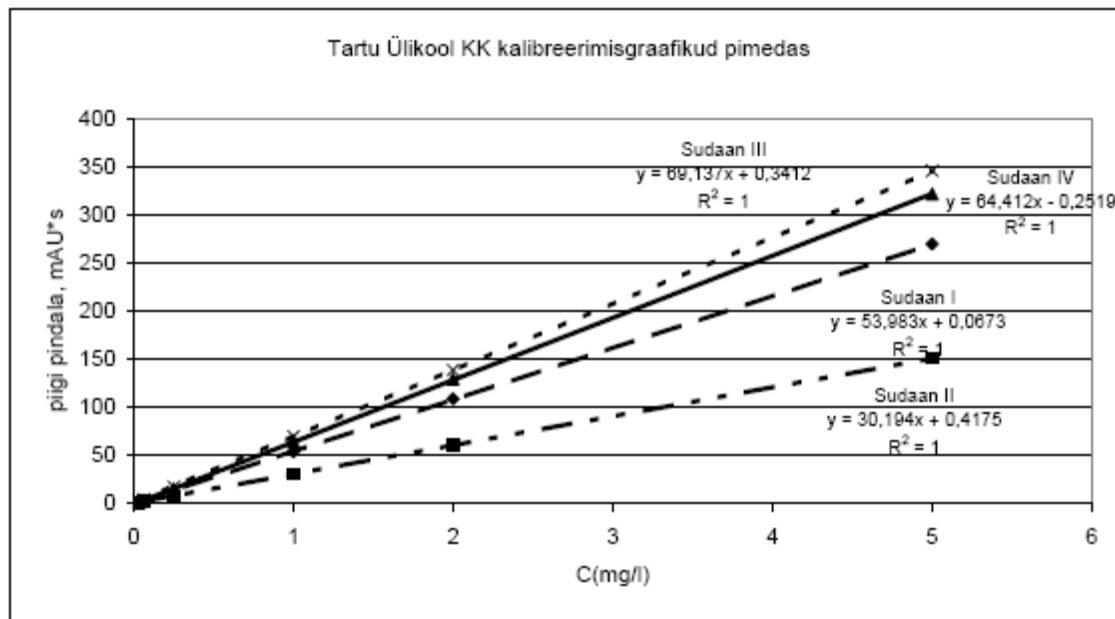
Kalibreerimisgraafiku koostamiseks valmistati kõigepealt Sudaan I – IV vahelahus (vt 2.2.3), millest tehti edasi graafiku koostamiseks vajalikud lahused (vt 2.2.3). Kalibreerimisgraafik koostati teljestikus pindala kontsentratsioon. Graafikutelt (joonised 9 ja 10) on näha, et Sudaan I – IV sõltuvus kontsentratsioonist on lineaarne vahemikus 0,03125 kuni 10 mg/l. Nagu näha valges tehtud kalibreerimisgraafiku puhul on regressioonisirge R^2 väärtus TKI Tartu Labori andmete põhjal Sudaan I – IV vastavalt 1,0; 0,9999; 0,9999 ja 0,9999 ning Tartu Ülikooli KK vastavalt 0,9999; 0,9998; 0,9999 ja 0,9999. Tartu Ülikooli KK tehti Sudaan I – IV kalibreerimisgraafik ka pimedas (joonis 11), mille regressioonisirge R^2 väärtused on vastavalt 1; 1; 1 ja 1.



Joonis 9. TKI Tartu labori kalibreerimisgraafik



Joonis 10. Tartu Ülikool KK kalibreerimisgraafik



Joonis 11. Tartu Ülikool KK kalibreerimisgraafik pimedas.

3.2.2. Valideerimise tulemused

Lisamisi viidi läbi kahes maatriksis – kastmes ja maitseainesegus kahel kontsentratsioonil. Lisati Sudaan I –IV maatriksile, mis ei sisaldanud lisatavaid aineid. Maitseainesegu puhul lisati 1 g proovile 2,5 µg ja 50 µg Sudaan I – IV ning kastmete korral lisati 2,5 µg ja 100 µg 5 g proovile (standardi värvaine sisaldust võetakse arvesse lõpptulemuse arvutamisel). Lisamisi tehti 6 nii madalal kui ka kõrgel kontsentratsioonil ning nendest tulemustest arvutati saagised, avastamis- ja määramispiirid, täpsus.

Saagised

Nagu juba eelpool mainitud viidi saagise arvutused läbi kahel kontsentratsioonil ja maatriksis. Saagised Sudaan I – IV arvutati vastavalt valemile (3). Saagiste arvutused on toodud ära lisa 12 ja 13. Kokkuvõtte saagistest (maitseainesegus ja kastmes) on toodud tabelis 8.

Tabel 8. Saagiste koondtabel

Maatriks		Sudaan I		Sudaan II		Sudaan III		Sudaan IV		
Maitseaine- segu	Lisamine mg/kg	2,425	48,5	2,25	45	2,375	47,5	2,0	40	
	Saagis %	TKI	96,0	86,5	91,7	86,3	88,0	71,4	72,1	60,2
		KK	93,0	82,9	92,1	84,6	106,7	70,7	72,3	50,8
Kaste	Lisamine mg/kg	0,485	19,4	0,45	18	0,475	19	0,4	16	
	Saagis %	TKI	87,5	92,3	85,4	96,2	95,9	85,2	101,7	80,1
		KK	87,2	89,5	84,1	95,2	97,0	83,3	87,1	73,0

Avastamis- ja määramispiir

Avastamis- ja määramispiiri kvantitatiivseks kindlaks tegemiseks viidi läbi lisamiskatsed madalal kontsentratsioonil. Käesolevas töös arvutati määramispiir valemi (1) ja avastamispiir valemi (2) põhjal. Avastamispiir maitseainesegus Sudaan I – IV korral vahemikus 0.10 – 0.34 mg/kg ja määramispiir 0.33 – 1.13 mg/kg ning kastmes avastamispiir 0.01 – 0.06 mg/kg ja määramispiir 0.03 – 0.19 mg/kg (lisa 12 tabel 3a,b, lisa 13 tabel 6a,b). Kokkuvõtte avastamis- ja määramispiirid maitseainesegus ja kastmes on toodud tabelis 9.

Tabel 9. Avastamis- ja määramispiiri koondtabel.

Maatriks			Sudaan I	Sudaan II	Sudaan III	Sudaan IV
Maitseaine-segu	LOD mg/kg	TKI	0,17	0,10	0,13	0,13
		KK	0,26	0,20	0,33	0,26
	LOQ mg/kg	TKI	0,57	0,33	0,42	0,42
		KK	0,87	0,67	1,11	0,87
Kaste	LOD mg/kg	TKI	0,01	0,03	0,02	0,01
		KK	0,02	0,02	0,06	0,03
	LOQ mg/kg	TKI	0,03	0,11	0,08	0,05
		KK	0,08	0,08	0,19	0,10

Kastme korral jääb arvutuslik määramispiir mõnel juhul lineaarsest alast välja ning seetõttu võetakse määramispiiriks TKI Tartu Laboris Sudaan I ja IV korral 0,063 mg/kg (vastab kalibreerimisgraafiku esimesele punktile).

Tundlikkus

Nagu peatükis 1.5, öeldud kasutatakse tundlikkuse iseloomustajana kalibreerimisgraafiku tõusu. Kalibreerimisgraafiku tõusud on toodud tabelis 10.

Tabel 10. Kalibreerimisgraafiku tõusud.

Näitaja		Sudaan I	Sudaan II	Sudaan III	Sudaan IV
T	TKI	47,244	32,638	57,490	52,686
Õ	KK	52,459	34,967	63,993	59,839
U	KK	53,983	30,194	69,137	64,412
S	(pimedas)				

Järeldus: Mida kõrgem on kalibreerimisgraafiku tõus, seda tundlikum. Väike muutus määratava komponendi kontsentratsioonis annab tulemuseks detekteerimis seadme signaali suure muutuse.

Täpsus

Täpsuse hindamiseks analüüsiti mitmel eri päeval FAPAS maitseaineseгу, mis sisaldas Sudaan I ja Sudaan IV. Saadud mõõtetulemustest leiti Sudaan I ja IV kokkulangevus, mida iseloomustatakse absoluutse-, relatiivse standardmääramatuse või variatsiooni koefitsiendi abil. Standardmääramatuse arvutamiseks kasutatakse valemit

$$S(c) = \sqrt{\sum_i^n (c_i - \bar{c})^2 / n - 1} \quad (4)$$

ja relatiivsestandardmääramatuse arvutamiseks valemit

$$RSD = S(c) / \bar{c} * 100 . \quad (5)$$

Tulemused on toodud tabelis 11.

Tabel 11. FAPAS proovi täpsus

Nimetus	Päev 1	Päev 2	Päev 3	Average	Stdev	RSD	RSD%
Sudaan I	27,26	26,27	28,22	27,25	0,98	0,04	3,58
Sudaan IV	12,42	14,59	14,1	13,70	1,14	0,08	8,31

3.2.3. Mõõtemääramatus

Käesolevas töös arvatati Sudaan I – IV mõõtemääramatus GUM Workbench TrainMiC Version 1.3.3.132 abil (lisa 15). Saadud tulemused on toodud kokkuvõetuna tabelis 12.

Tabel 12. Sudaan I – IV mõõtemääramatused kastmes ja maitseaineseegu.

Maatriks	Näitaja	Tulemus	
		TKI	KK
Maitseaineseegu	Sudaan I	(2,43 ± 0,32) mg/kg, k=2 norm. (48,5 ± 2,0) mg/kg, k=2 norm.	(2,42 ± 0,31) mg/kg, k=2 norm. (48,5 ± 1,6) mg/kg, k=2 norm.
	Sudaan II	(2,25 ± 0,27) mg/kg, k=2 norm. (45,0 ± 2,1) mg/kg, k=2 norm.	(2,25 ± 0,68) mg/kg, k=2 norm. (45,0 ± 2,2) mg/kg, k=2 norm.
	Sudaan III	(2,375 ± 0,43) mg/kg, k=2 norm. (47,5 ± 4,1) mg/kg, k=2 norm.	(2,37 ± 0,31) mg/kg, k=2 norm. (47,5 ± 4,1) mg/kg, k=2 norm.
	Sudaan IV	(2,00 ± 0,52) mg/kg, k=2 norm. (40,0 ± 5,2) mg/kg, k=2 norm.	(2,00 ± 0,34) mg/kg, k=2 norm. (40,0 ± 5,6) mg/kg, k=2 norm.
Kaste	Sudaan I	(0,48 ± 0,10) mg/kg, k=2 norm. (19,4 ± 1,51) mg/kg, k=2 norm.	(0,48 ± 0,06) mg/kg, k=2 norm. (19,4 ± 1,46) mg/kg, k=2 norm.
	Sudaan II	(0,45 ± 0,06) mg/kg, k=2 norm. (18 ± 1,46) mg/kg, k=2 norm.	(0,45 ± 0,14) mg/kg, k=2 norm. (18 ± 1,49) mg/kg, k=2 norm.
	Sudaan III	(0,474 ± 0,08) mg/kg, k=2 norm. (19 ± 1,77) mg/kg, k=2 norm.	(0,474 ± 0,06) mg/kg, k=2 norm. (19 ± 2,1) mg/kg, k=2 norm.
	Sudaan IV	(0,40 ± 0,07) mg/kg, k=2 norm. (16 ± 1,14) mg/kg, k=2 norm.	(0,40 ± 0,04) mg/kg, k=2 norm. (16 ± 1,39) mg/kg, k=2 norm.

Võib öelda, et madalatel kontsentratsioonidel on mõõtemääramatus kuni 30 % ja kõrgetel kontsentratsioonidel kuni 15 % analüüsi tulemusest.

Sudaan III ja IV korral avaldab mõju mõõtemääramatusele ka valgus. Kui seda arvestada, siis madalatel kontsentratsioonidel on mõõtemääramatus kuni 50 % ja kõrgetel kuni 20 % tulemusest.

3.3. Analüüsitud proovid ja tulemused

Antud meetodil analüüsiti kokku TKI Tartu Laboris ja Tartu Ülikooli KK ca 80 Eesti turul olevat toodet. Toodetest oli esindatud palju erinevaid kastmeid ja maitseainesegusid. Analüüsitud proovides ei registreeritud Sudaan I – IV leidumist.

TKI Tartu Laboris kasutati meetodi juurutamisel FAPAS maitseainesegu, kontrollimaks meetodi toimimist. Mida analüüsiti ja saadi järgmised tulemused (kromatogrammi vt lisa 14):

FAPAS (maitseaine)	Korraldaja tulemus (mg/kg)	Analüüsitud proovi keskmine tulemus(mg/kg) (saagisega parandatud)
Sudaan I	25,6	27,25
Sudaan IV	13,6	13,70

Labori tulemuse ja referentsväärtuse vahelise kooskõla hindamiseks kasutatakse normeeritud hälbeid ehk niinimetatud E_n arve [35]. E_n arvutamiseks kasutatakse järgmist valemit:

$$E_n = \frac{C_{lab} - C_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}, \quad (6)$$

kus C_{lab} – saadud tulemus, C_{ref} – referentsväärtus, U_{lab} -labori laiendmääramatus ja U_{ref} -referentsväärtuse laiendmääramatus.

E_n väärtuseid tõlgendatakse järgmiselt:

1. Kui $|E_n| \leq 1$, siis tulemus on referentsväärtusega kooskõlas;
2. Kui $|E_n| > 1$, siis tulemus ei ole referentsväärtusega kooskõlas.

Fapas proovile arvutati vastavalt valemile (6) E_n väärtused, mis on järgmised: Sudaan I E_n väärtus 1,1 ja Sudaan IV E_n väärtus 0,05.

Koostöös Soome Tollilaboriga saadi analüüsiks kaks proovi (maitseainesegu ja kaste), mille analüüsimisel saadi järgmised tulemused (kromatogramme vt lisa 14):

1. proov (kaste):

Sudaan I ($0,46 \pm 0,06$) mg/kg, $k=2$ norm.

2 proov (maitseaine):

Sudaan I ($136,2 \pm 4,4$) mg/kg, $k=2$ norm.

Sudaan IV ($5,20 \pm 0,9$) mg/kg, $k=2$ norm.

Soome Tollilabori tulemused:

1. proov (kaste):

Sudaan I 0,55 mg/kg

2. proov (maitseaine):

Sudaan I ja Sudaan IV kokku 170 mg/kg

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös loodi ja valideeriti HPLC ja LC/MS meetod Sudaan I – IV määramiseks maitseainesegudes ja kastmetes. Lisaks anti lühike ülevaade Sudaan I – IV värvainetest ja nende määramisel kasutatavatest meetoditest.

Sudaan III ja IV kromatogrammidel on näha kahte piiki – nn “kiiret” ja “aeglast”. “Kiire piik” tekib, kui proovi lahust hoitakse enne süstimist valguse käes ja see kaob kui proovi hoitakse enne analüüsi ligikaudu 1,5 tundi pimedas. Nende valgusest tingitud efektide põhjuseks Sudaan III ja IV puhul loeti fotokroomset EZ-isomerisatsiooni. Sudaan I ja II kromatogrammidel nähti vaid ühte piiki, mis viitab kas fotokroomse isomerisatsiooni puudumisele või selle suurele kiirusele antud tingimustel. Eksperimentaalselt hinnati valguse mõju tulemustele kasutades pimedas ja valguses mõõdetud kalibratsioonigraafikuid. Näidati, et Sudaan I ja II korral UV/Vis detekteerimisega olid graafiku tõusud sarnased, samas Sudaan III ja IV puhul osutus tõusude suhteline erinevus suureks põhjustades analüüsil üle 10 % suhtelise vea. Lisaks võivad Sudaan III ja IV „kiire piigi” retentsiooniajad olla vastavalt Sudaan I ja II omadele lähedased, mille tulemusel võib esineda valepositiivse tulemuse andmise oht, kui kasutatakse ainult UV/Vis detekteerimist. Samas võib „kiire piigi” teket kasutada ka Sudaan III ja IV esinemise kinnituseks. See on eriti kasulik, kui rakendatakse ainult UV/Vis detektorit.

Proovi ettevalmistus koosnes käesolevas meetodis mitmekordset solvendiga (atsetooniga) ekstraheerimisest, ekstrakti kokku aurutamisest ning lahustamisest atsetonitriil/puhvri (82/18) segus ja lõpuks ekstrakti filtreerimisest läbi süstlafiltrit. Ekstrakt analüüsiti kasutades HPLC ja LC/MS (LC/MS korral toimus kvantiseerimine DAD-i järgi) seadmeid. Kromatograafiline eraldamine viidi läbi pöördfaas kolonnidel Spherisorb ODS2 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) ja Zorbax EclipseXDB C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). Optimaalne kromatograafiline lahutus saavutati HPLC puhul eluendi voolukiirusel 1,5 ml/min ja LC/MS puhul voolukiirusel 0,8 ml/min, kasutades gradient elueerimist atsetonitriili ja puhverlahusega. Kvantiseerimine viidi läbi Sudaan I, II ja III korral lainepikkusel 480 nm ja Sudaan IV puhul 540 nm juures.

Antud meetodi korral on avastamispiir maitseainesegudes vahemikus 0,1 – 0,34 mg/kg ja kastmete korral vahemikus 0,01 – 0,06 mg/kg, mis täidab EL nõude LoD osas (0,5-1,0 mg/kg). Määramispiir maitseainesegudes on vahemikus 0,33 – 1,13 mg/kg ja kastmes vahemikus 0,063 – 0,19 mg/kg. Lineaarsus, täpsus ja saagis olid head. Valideerimisel leiti, et kirjeldatud meetod on sobiv Sudaan I – IV igapäevaseks määramiseks maitseainesegudes ja

kastmetes. Käesolev meetod on akrediteeritud ning rutiinkasutuses TKI Tartu Laboris. Käesoleva meetodiga on kokku analüüsitud ca 80 proovi, kuid positiivseid tulemusi siiani ei leitud.

SUMMARY

In this work HPLC and LC/MS method for analysis Sudan I – IV in sauces and spices mixture was developed and validated. In addition a small overview has been given of Sudan I – IV and methods what are used in analysis.

In the chromatograms of Sudan III and Sudan IV two peaks were observed – termed as „fast“ and “slow“ peaks. „Fast“ peak appeared when the sample solution was stored in light prior to injection and did not appear when the sample was kept in darkness for about 1,5 hours before analysis. Those light-induced effects in chromatograms of Sudan III and IV were attributed to photochromic E-Z isomerism of the substances. In the chromatograms of Sudan I and II only one peak was observed indicating, that the photochromic equilibrium is absent or too fast under the given conditions. The effect of light on the analysis of Sudan I – IV was estimated using calibrations in light and dark. It was shown that with UV/Vis detection the calibration graph slopes for Sudan I and II were similar whereas, for Sudan III and IV the relative difference of slopes was significant leading to a quantification error over 10 %. In addition, the “fast peaks” of Sudan III and IV can have similar retention times to Sudans I and II, that can produce false-positive results when only UV/Vis detection is used for analysis. On the other hand, appearance of the „fast peak” could be employed to confirm the identity of Sudan III and IV in the sample. This may be especially useful when only UV/Vis detection is available.

The sample preparation step of the method consisted of multiple liquid extraction with acetone, solvent evaporation and solvent exchange to acetonitrile/buffer (82/18) and finally filtration through syringe filter. The extract was analyzed on HPLC and LC/MS (quantified by DAD) using reversed phased columns Spherisorb ODS2 C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) and Zorbax EclipseXDB C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm).

Optimal chromatographic separation was obtained with gradient elution at the follow rate of 1.5 ml/min for HPLC and 0.8 ml/min for LC/MS, using mixture of acetonitrile with aqueous buffer solution. The compounds were quantified using DAD: Sudan I, II and III at wavelength 480 nm and Sudan IV at 540 nm.

For current method the limit of detection in spices is between 0,1 – 0,34 mg/kg and in sauces between 0,01- 0,06 mg/kg, which fulfill the EU demand for LoD (0,5 to 1,0 mg/kg). Limit of quantification in spices is between 0,33 -1,13 mg/kg and in sauces is between 0,063-0,19 mg/kg. Linearity, precision and recovery were satisfactory. Validation showed that current

method was the best for daily analysis of Sudan I – IV in spices and sauces. The method is accredited and is used for routine analysis in HPI Tartu Laboratory. With this method about 80 samples have been analysed but so far no positive results have been produced.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Commission decision of 23 May 2005 on emergency measures regarding chilli products, curcuma and palm oil (2005/402/EC) L135/134 *Official Journal of the European Union*
2. J. Okada, R. Kanbe, M. Kuzukawa, Y. Ikeda, K. Yoshimura, R. Hayakawa, K. Matsunaga, Identification of contact allergens in C.I.Solvent Red 23 (commercial Sudan III) by chemical analysis and animal testing, *Contact Dermatitis*, 25 (1991) 313
3. V. Cornet, Y. Govaert, G. Moens, J. V. Loco, J. – M. Degroodt, Development of Fast Analytical Method for the Determination of Sudan Dyes in Chili- and Curry-Containing Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection, *J. Agric. Food Chem.*, 54, (2006) 639
4. About fiscal marking of fuels in European Union, <http://www.euromarker.com>, viimati alla laetud 15.09.2006
5. B. Lembecke, B. Braden, J. Stein, *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 32(1994) 256
6. <http://www-cie.iarc.fr/monoeval/eval.html>, viimati uuendatud 05.01.1999
7. Dyes Sudan I to IV in food, Federal Institute for Risk Assessment, 2003, http://www.bfr.bund.de/cm/245/dyes_Sudan_IV.pdf, viimati alla laetud 17.08.2006
8. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/qanda_en.pdf, viimati alla laetud 24.04.07
9. <http://www.aospaceurope.com/katrinhoenicke.pdf>, viimati alla laetud 02.05.2007
10. Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm, viimati alla laetud 07.05.2007
11. H. Bouar-Laurent H. Dürr, Organic Photochromism, *Pure Appl. Chem.*, 73 (2001) 639
12. H. Rau, in H, Dürr, H. Bouas Laurent (Editors), Photochromism: Molecules and systems., *Elsevier, Amsterdam*, 2006, 165
13. A. Chembran, F. Bernardi, M. Garavelli, L. Gagliardi, G. Orlandi, On the Mechanism of the cis-trans Isomerization in the Lowest Electronic States of Azobenzene: S_0 , S_1 and T_1 , *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 3234
14. N.Biswas, S. Umpathy, Density Functional Calculations of Structures, Vibrational Frequencies, and Normal Modes of trans- and cis-Azobenzene, *J. Phys. Chem. A*, 101 (1997)5555

15. R. Haessner, H. Mustroph, R. Borsdorf, Untersuchungen zum UV/VIS-Spektralverhalten von Azofarbstoffen: VIII-Quantitative Untersuchungen zur Tautomerie substituierter 1-Phenylazo-2-naphthole mittels UV/VIS-Spektroskopie, *Dyes Pigm.*, 6 (1985) 277
16. E. Hadjouodis, in H. Dürr, H. Bouas-Laurent (Editours), Photochromism: Molecuels and systems, Elsevier, Amsterdam, 2006, 685
17. H. Mustroph, R. Bortel, Zum Einfluß von Substituenten auf die Farbe von Derivaten des 1-Phenylazo-2-naphthols, *Journal f. prakt. Chemie* 324 (1982) 743
18. H. F. Dos Santos, L. F. C. De Oliveira, S. O. Dantas, P. S. Santos, W. B. de Almeida, Quantum Mechanical Investigation of the Tautomerism in the Azo Dye Sudan III, *Int.J. Quantum Chem.*, 80 (2000) 1076
19. L. Antonov, S. Stoyanov, T. Stoyanova, Tautomeric Equilibrium in 1-Phenylazo-2-Naphthol- A Quantitative Study, *Dyes Pigm.*, 27 (1995)133
20. Method 145 A, Collabortive trial 145 of a method for the detection and determination of Sudan I in Chilli products by HPLC, www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/sudan145a.pdf, viimati alla laetud 20.08.2005
21. Method 145 B, Collabortive trial 145 of a method for the detection and determination of Sudan I in Chilli products by HPLC, www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/145b.pdf, viimati alla laetud 06.01.2006
22. F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistarà, I. Zagnoni, Development and in-house validation of a liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products, *Journal of Chrom. A* 1042 (2004)123-130
23. F. Tateo, M. Bononi, Fast determination of Sudan I by HPLC/APCI-MS in Hot Chilli, Spices and Oven-Baked Foods, *J. of Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 655-658
24. F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, Accurate mass measurements for the confirmation of Sudan azo-dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadrupole orthogonal-acceleration time of flight mass spectrometry, *Journal of Chrom. A*, 1058 (2004) 127-135.
25. M. Ma, X. Luo, B. Chen, S. Su, S. Yao, Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry, *Journal of Chrom. A*, 1103(2006)170-176

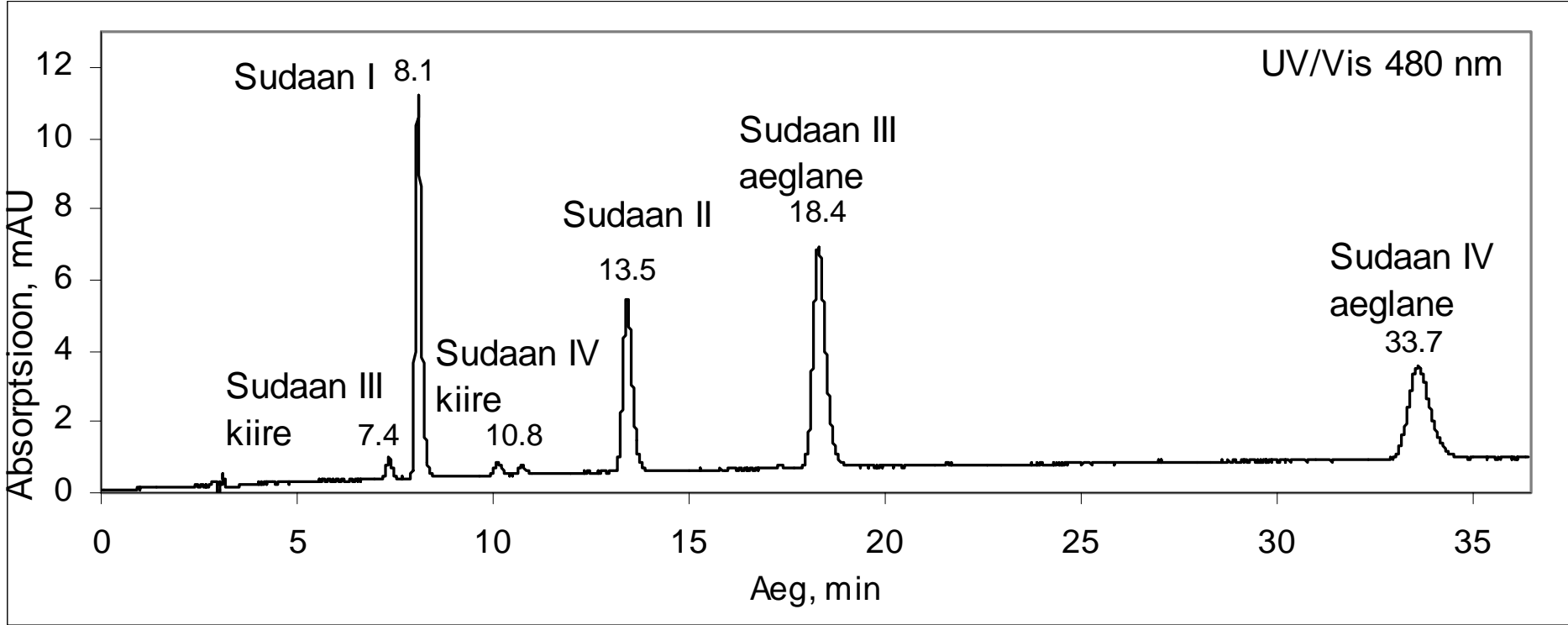
26. E. Mejia, Y. Ding, M. F. Mora, C. D. Garcia, Determination of banned sudan dyes in chili powder by capillary electrophoresis, *Food Chem.*, 102(2007) 1027
27. Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Sun, Development and optimization of an analytical method for the determination of Sudan dyes in hot chilli pepper by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated BrO⁻ -luminol chemiluminescence detection, *Journal of Chrom. A*, 1129 (2006) 34
28. M. Mazzetti, R. Fascioli, I. Mazzoncini, G. Spinelli, I. Morelli and A. Bertoli, Determination of 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in chilli powder and in chilli-containing food products by GPC clean-up and HPLC with LC/MS confirmation, *Food Additives and Contaminants*, Vol. 21, No. 10 2004, pp. 935-941.
29. S. Guffogg, P.A. Brown, S.G. Stangroom, C. A. Sutherland, The detection of Sudan I, II, III and IV in palm oil by thin-layer chromatography, Food Standards Agency information bulletin on methods of analysis and sampling for foodstuffs, No.52, Detsember,2004, <http://www.food.gov.uk>, viimati alla laetud 15.11.2006
30. <http://astaspice.org/bubs/SudanWhatePaper.pdf>, viimati alla laetud 26.04.07
31. The Fitness for Purpose Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM, LGC, Teddington,1998, <http://www.eurachem.ul.pt/quides/mval.html>, viimati alla laetud 15.09.2006
32. Y.Fang, M. Zumwalt, Using TOF for screening and quantitation of sudan red colorants in food. Agilent Application. <http://www.agilent.com/>, viimati alla laetud 25.11.2006
33. K. VanTran, M.S. Young,U.Neue, Waters Poster, <http://www.waters.com/>, viimati alla laetud 20.01.2007
34. J.Kowalski, Analysis of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV using LC UV and LC MS, Presented at Pittcon, Orlando, March 12-17,2006, http://www.restek.com/promo_pittcon_2006, viimati alla laetud 15.01.2007
35. ISO Guide 43-1 Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons. Part 1: Development and Operation of Proficiency Testing Schemes, ISO/IEC 1997

LISAD

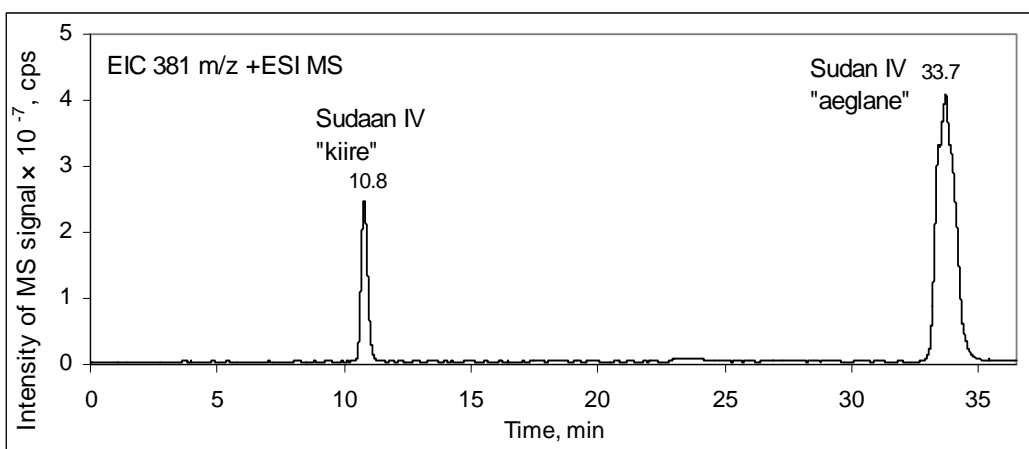
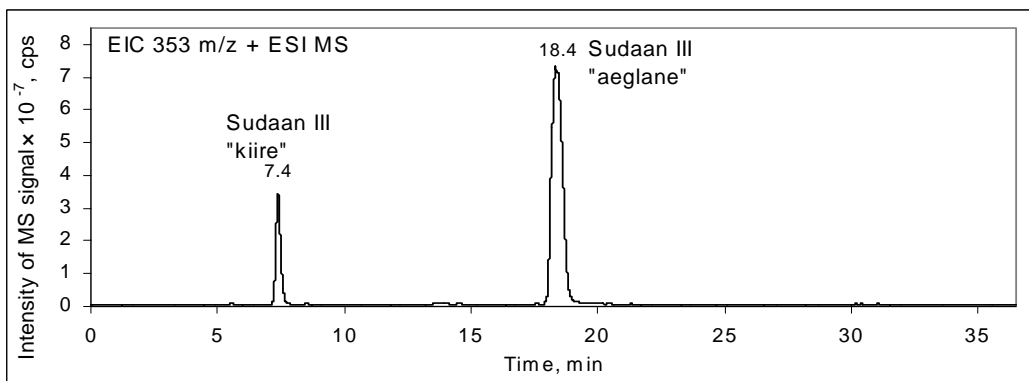
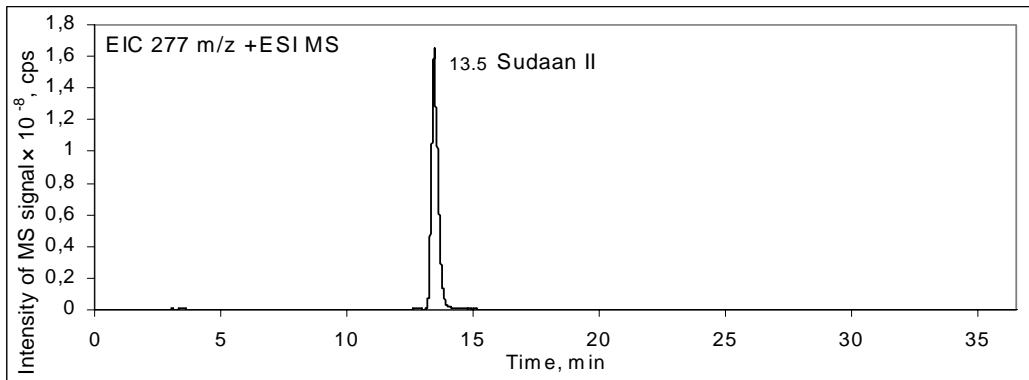
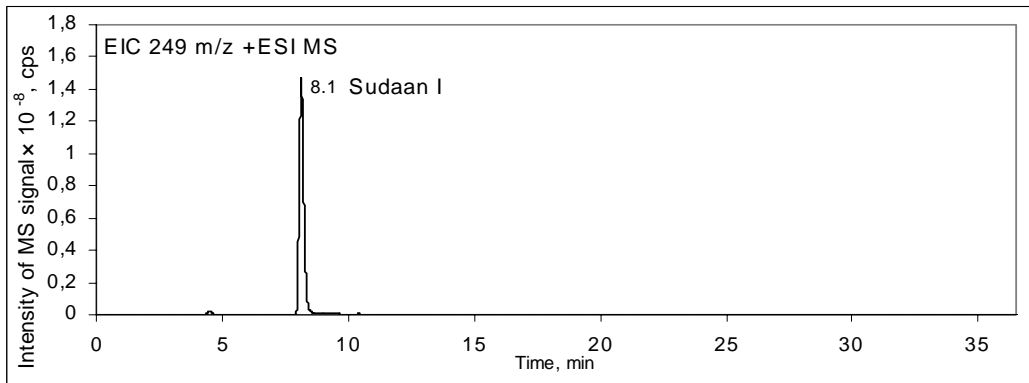
Lisa 1. Massispektromeetri parameetrid

<i>Nimetus</i>	<i>Capillary (V)</i>	<i>Skimmer (V)</i>	<i>Cap Exit (V)</i>	<i>Oct 1 (V)</i>	<i>Oct 2 (V)</i>	<i>Trap drive</i>	<i>Oct RF</i>	<i>L1 (V)</i>	<i>L2 (V)</i>	<i>Frag Ampl (V)</i>
Sudaan I	5000	34,43	81,64	12,34	0,78	39,91	120,98	-5,41	-60,16	0,74
Sudaan II	5000	29,51	59,84	11,72	1,19	35,64	88,85	-4,43	-57,21	0,89
Sudaan III	5000	26,23	97,21	12,34	1,19	39,66	143,93	-5,16	-58,69	1,06
Sudaan IV	5000	29,51	78,52	14,18	1,43	43,14	153,11	-4,67	-48,36	1,26

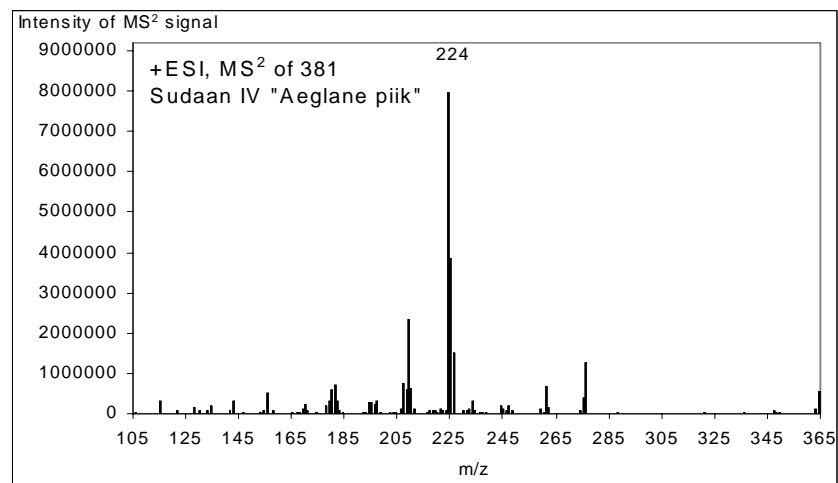
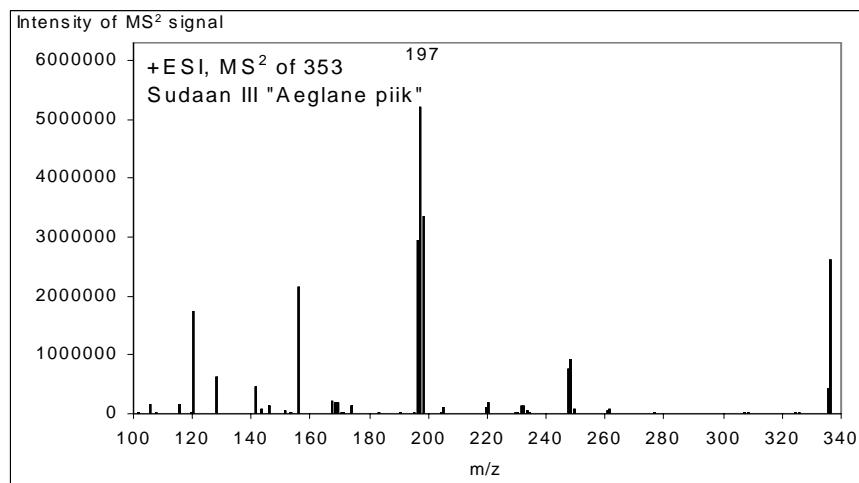
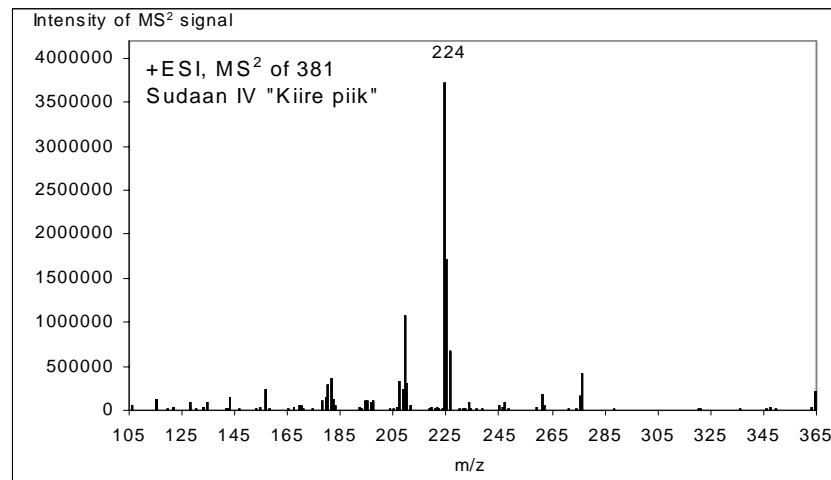
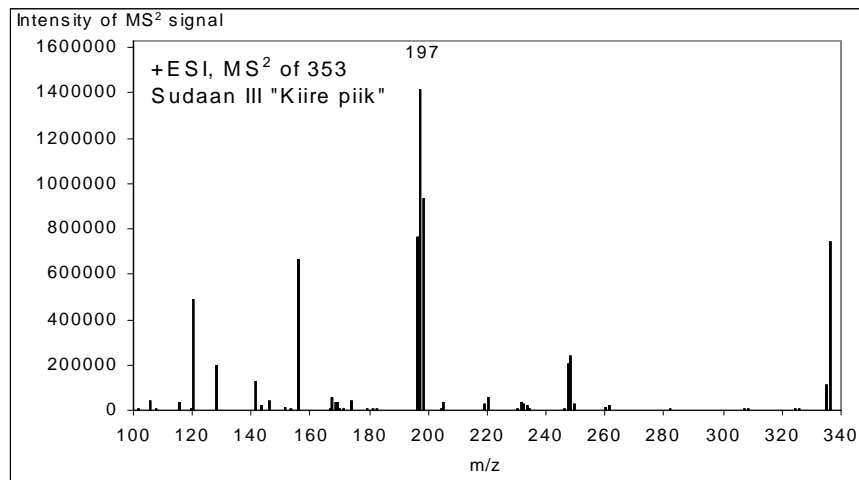
Lisa 2. Sudaani standardlahuse (2 mg/l) UV/Vis kromatogramm



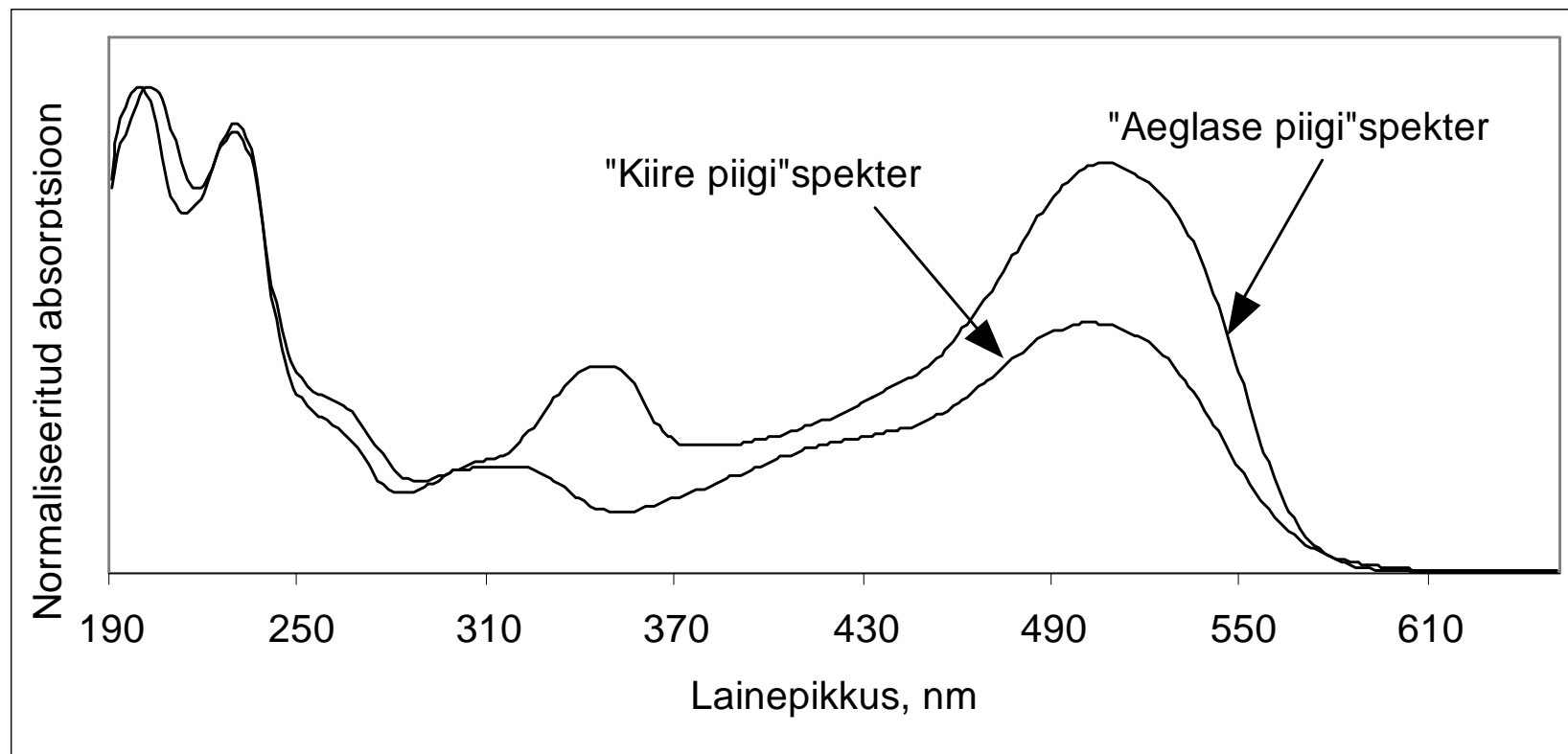
Lisa 3. Sudaani standardlahuse (2 mg/l) EIC kromatogramm



Lisa 4. Sudaanide MS² spektrid



Lisa 5. Sudaan III "aeglase piigi" ja "kiire piigi" UV/Vis spekter



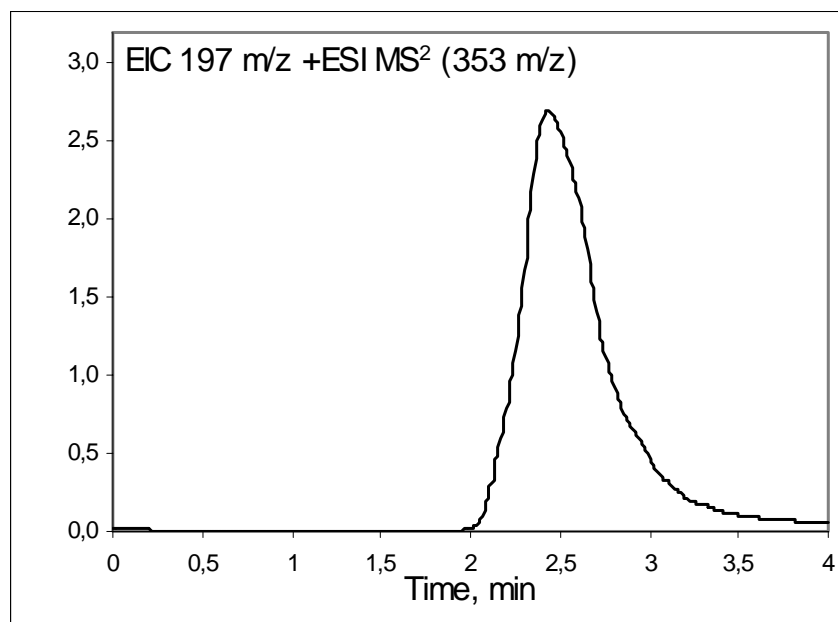
Lisa 6. Sudaan I – IV kromatograafilised omadused

Nimi	Tavaline eraldamine		Lihtne eraldamine	
	Aeg (min)	Mahtuvus-faktor ^a	Aeg (min)	Mahtuvus-faktor ^b
Sudaan III “kiire piik”	7.3	1.4	0.9	3.5
Sudaan I	8.1	1.7		
Sudaan IV “kiire piik”	10.8	2.6		
Sudaan II	13.5	3.5		
Sudaan III “aeglane piik”	18.8	5.3	2.4	11
Sudaan IV “aeglane piik”	33.7	10.2		

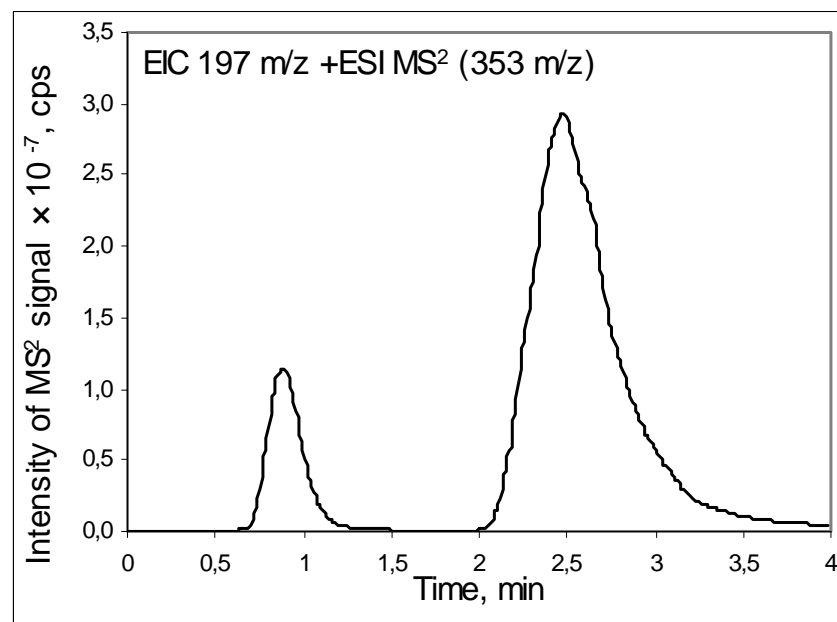
^a Süsteemi surnud aeg 3.0 min.

^b Süsteemi surnud aeg 0.2 min

Lisa 7. Sudaan III “Kiire” ja “Aeglase” piigi EIC kromatogramm

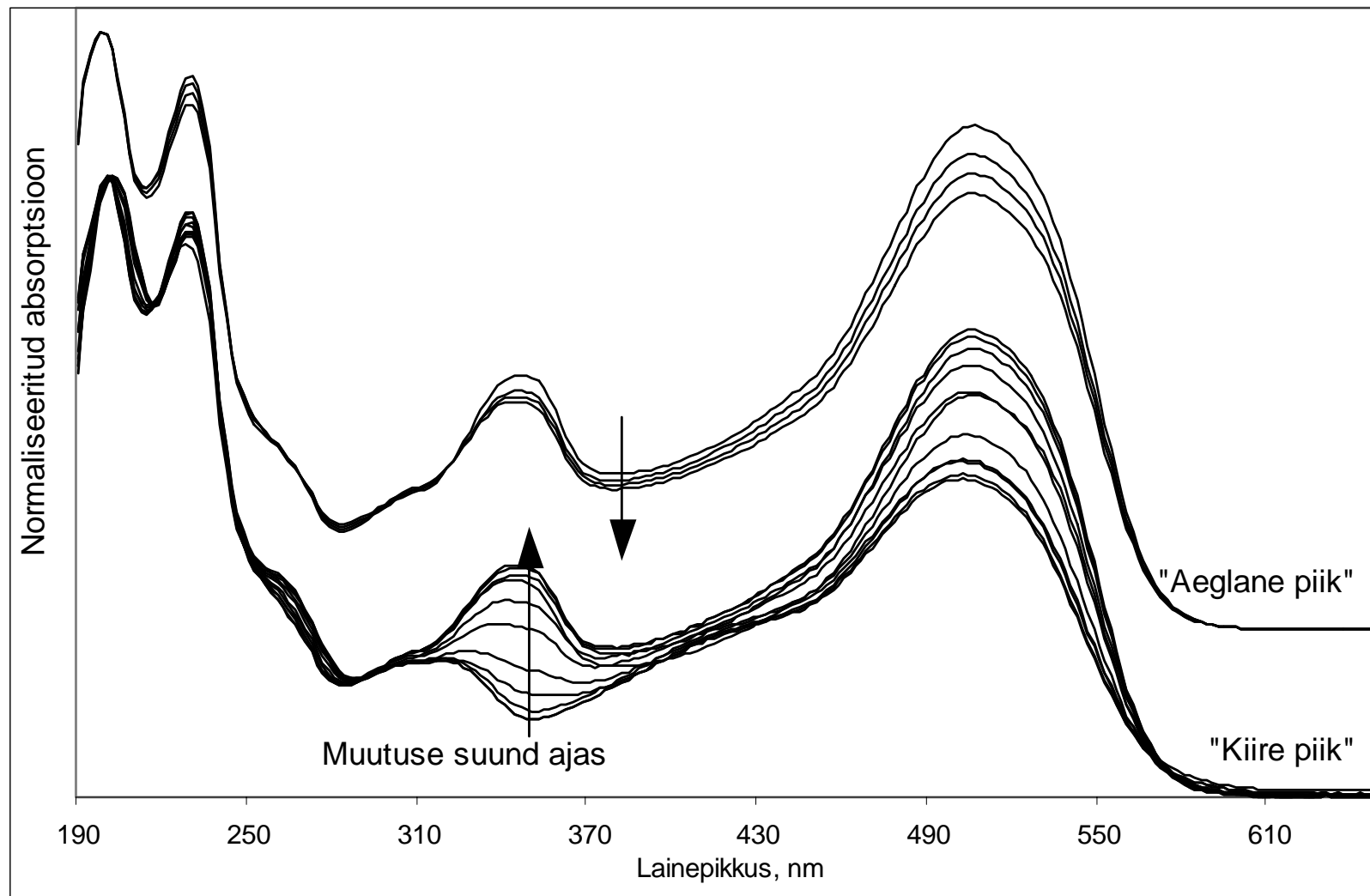


a)proov, mida on hoitud täielikus pimeduses

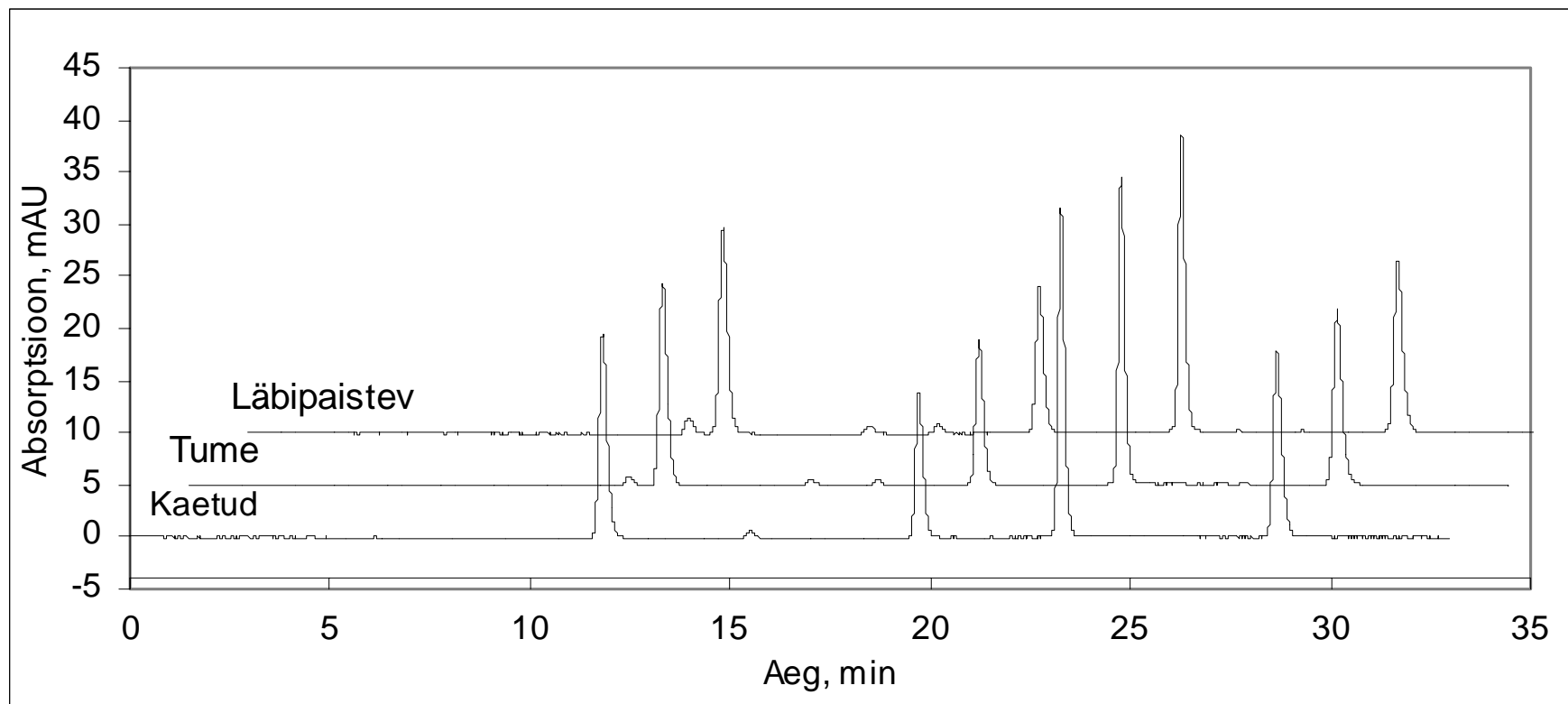


b)sama proov, mis on viidud intensiivse valguse kätte

Lisa 8. Sudaan III "aeglase" ja "kiire" piigi UV/Vis spektri muutus ajas



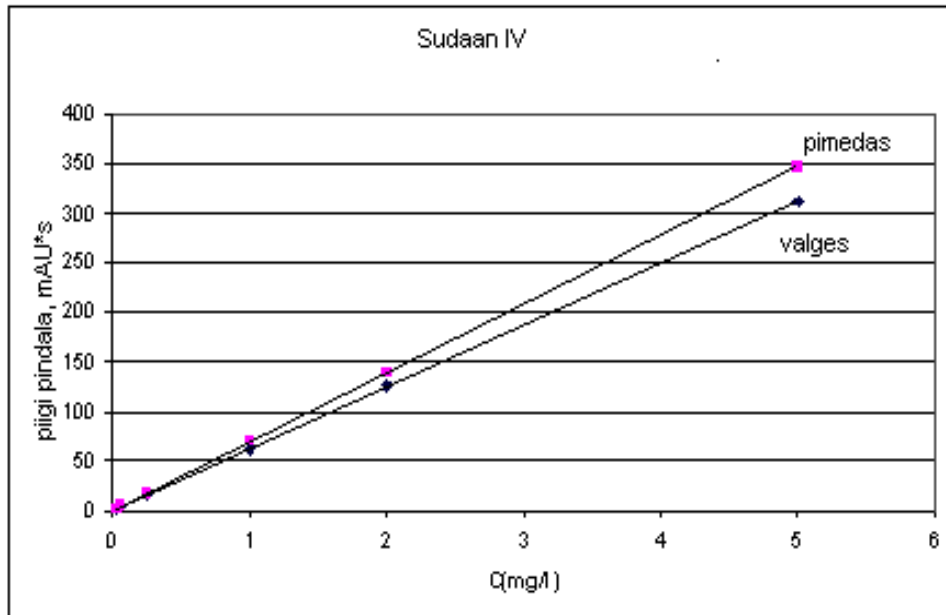
Lisa 9. Sudaan I- IV standardlahus analüüsituna kasutades erinevaid viaale



Lisa 10. Sudaan I – IV kalibratsiooni andmed pimedas ja normaalses valguses kasutades UV/Vis ja MS² detekteerimist

Määramine		Sudaan I		Sudaan II		Sudaan III “aeglane piik”		Sudaan IV “aeglane piik”	
		Valem	R ²	Valem	R ²	Valem	R ²	Valem	R ²
UV/Vis	Valges	$y=53.9676x - 0.1279$	1.0000	$y=29.9882x + 0.2949$	1.0000	$y=57.7079x - 0.3680$	1.0000	$y=62,372x + 0.0355$	1.0000
	Pimedas	$y=53.9828x + 0.0673$	1.0000	$y=30.1943x + 0.4175$	1.0000	$y=64.4122x - 0.2804$	1.0000	$y=69,137x + 0.3412$	1.0000
MS ²	Valges	$y=3.0343x - 0.0119$	0.9998	$y=2.7646x + 0.1527$	0.9885	$y=0.3332x - 0.0078$	0.9991	$y=0.1296x - 0.0045$	0.9971
	Pimedas	$y=3.2432x - 0.0284$	0.9998	$y=2.8583x + 0.1422$	0.9953	$y=0.3493x - 0.0055$	0.9992	$y=0.1250x - 0.0052$	0.9977

Lisa 11. Sudaan III kalibreerimisgraafik pimedas ja valges



Lisa 12. TKI Tartu Labori arvutused

Tabel 1a. Saagiste arvutused maitseainesegus, kontsentratsioonidel Sudaan I 2,425; Sudaan II 2,25; Sudaan III 2,375 ja Sudaan IV 2,0 mg/kg.

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	10,34	0,23	2,26	2,425	93,18
L2	0,9999	10,45	0,23	2,28	2,425	94,17
L3	1,0001	10,52	0,23	2,30	2,425	94,68
L4	1,0002	10,72	0,23	2,34	2,425	96,43
L5	1,0002	10,99	0,24	2,39	2,425	98,68
L6	1,0001	10,98	0,24	2,39	2,425	98,59
Average	1,0001	10,67	0,23	2,33	2,425	95,96

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	7,15	0,21	2,10	2,25	93,35
L2	0,9999	6,94	0,20	2,04	2,25	90,79
L3	1,0001	6,84	0,20	2,01	2,25	89,55
L4	1,0002	7,14	0,21	2,10	2,25	93,24
L5	1,0002	7,00	0,21	2,06	2,25	91,44
L6	1,0001	7,01	0,21	2,06	2,25	91,60
Average	1,0001	7,02	0,21	2,06	2,25	91,66

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	10,60	0,21	2,10	2,375	88,58
L2	0,9999	10,10	0,20	2,02	2,375	85,16
L3	1,0001	10,37	0,21	2,07	2,375	86,98
L4	1,0002	10,84	0,21	2,14	2,375	90,27
L5	1,0002	10,49	0,21	2,09	2,375	87,83
L6	1,0001	10,66	0,21	2,11	2,375	89,03
Average	1,0001	10,51	0,21	2,09	2,375	87,98

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	8,22	0,14	1,39	2	69,38
L2	0,9999	8,27	0,14	1,40	2	69,78
L3	1,0001	8,69	0,15	1,46	2	72,96
L4	1,0002	8,90	0,15	1,49	2	74,57
L5	1,0002	8,79	0,15	1,47	2	73,68
L6	1,0001	8,60	0,14	1,44	2	72,25
Average	1,0001	8,58	0,14	1,44	2	72,10

Tabel 1b. Saagiste arvutused maitseainesegus, kontsentratsioonidel Sudaan I 48,5; Sudaan II 45,0; Sudaan III 47,5 ja Sudaan IV 40,0 mg/kg.

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0006	199,88	4,12	41,15	48,5	84,85
L2	0,9997	201,05	4,14	41,43	48,5	85,42
L3	1,0001	203,24	4,19	41,86	48,5	86,31
L4	1,0009	207,10	4,27	42,62	48,5	87,88
L5	0,9999	205,76	4,24	42,39	48,5	87,40
L6	1,0002	205,67	4,24	42,36	48,5	87,33
Average	1,000233	203,78	4,20	41,97	48,5	86,53

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0006	142,06	3,93	39,28	45	87,28
L2	0,9997	135,78	3,76	37,58	45	83,51
L3	1,0001	141,03	3,90	39,01	45	86,70
L4	1,0009	141,82	3,92	39,20	45	87,11
L5	0,9999	142,35	3,94	39,38	45	87,52
L6	1,0002	138,99	3,85	38,45	45	85,44
Average	1,000233	140,34	3,88	38,82	45	86,26

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0006	201,52	3,37	33,63	47,5	70,81
L2	0,9997	189,29	3,16	31,64	47,5	66,61
L3	1,0001	203,85	3,40	34,04	47,5	71,65
L4	1,0009	205,83	3,44	34,34	47,5	72,28
L5	0,9999	213,28	3,56	35,60	47,5	74,95
L6	1,0002	204,75	3,42	34,18	47,5	71,96
Average	1,000233	203,09	3,39	33,90	47,5	71,38

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0006	156,84	2,40	23,94	40	59,85
L2	0,9997	142,97	2,18	21,86	40	54,64
L3	1,0001	163,20	2,49	24,92	40	62,30
L4	1,0009	163,88	2,50	25,00	40	62,50
L5	0,9999	167,51	2,56	25,58	40	63,94
L6	1,0002	151,09	2,31	23,08	40	57,69
Average	1,000233	157,58	2,41	24,06	40	60,15

Tabel 2a. Saagiste arvutused kastmes, kontsentratsioonidel Sudaan I 0,485; Sudaan II 0,45; Sudaan III 0,475 ja Sudaan IV 0,40 mg/kg.

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	9,62	0,21	0,42	0,485	87,10
L2	5,0002	9,75	0,21	0,43	0,485	88,18
L3	5,0004	9,64	0,21	0,42	0,485	87,28
L4	5,0003	9,73	0,21	0,43	0,485	88,00
L5	5,0006	9,71	0,21	0,43	0,485	87,83
L6	5,0001	9,57	0,21	0,42	0,485	86,67
Average	5,000283	9,67	0,21	0,42	0,485	87,51

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	6,66	0,20	0,39	0,45	87,35
L2	5,0002	6,77	0,20	0,40	0,45	88,71
L3	5,0004	6,54	0,19	0,39	0,45	85,81
L4	5,0003	6,44	0,19	0,38	0,45	84,63
L5	5,0006	6,41	0,19	0,38	0,45	84,18
L6	5,0001	6,22	0,18	0,37	0,45	81,98
Average	5,000283	6,51	0,19	0,38	0,45	85,44

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	11,45	0,22	0,45	0,475	94,55
L2	5,0002	11,47	0,22	0,45	0,475	94,69
L3	5,0004	11,49	0,23	0,45	0,475	94,80
L4	5,0003	12,06	0,23	0,47	0,475	98,77
L5	5,0006	11,57	0,23	0,45	0,475	95,38
L6	5,0001	11,83	0,23	0,46	0,475	97,16
Average	5,000283	11,65	0,23	0,46	0,475	95,89

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	12,33	0,20	0,40	0,4	100,59
L2	5,0002	12,51	0,20	0,41	0,4	101,96
L3	5,0004	12,40	0,20	0,40	0,4	101,13
L4	5,0003	12,39	0,20	0,40	0,4	101,04
L5	5,0006	12,44	0,20	0,41	0,4	101,46
L6	5,0001	12,79	0,21	0,42	0,4	104,07
Average	5,000283	12,48	0,20	0,41	0,4	101,71

Tabel 2b. Saagise arvutus kastmes, kontsentratsioonidel Sudaan I 19,4; Sudaan II 18,0; Sudaan III 19,0 ja Sudaan IV 16,0 mg/kg.

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0008	412,46	8,48	16,96	19,4	87,43
L2	5	456,32	9,38	18,77	19,4	96,73
L3	5,0008	441,96	9,09	18,17	19,4	93,67
L4	5,0003	437,89	9,00	18,01	19,4	92,82
L5	4,9998	434,92	8,94	17,89	19,4	92,20
L6	5,0006	429,23	8,83	17,65	19,4	90,99
Average	5,000383	435,46	8,95	17,91	19,4	92,31

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0008	294,19	8,13	16,25	18	90,27
L2	5	325,36	8,98	17,97	18	99,83
L3	5,0008	321,29	8,87	17,74	18	98,57
L4	5,0003	317,50	8,77	17,53	18	97,42
L5	4,9998	314,33	8,68	17,36	18	96,45
L6	5,0006	309,34	8,54	17,08	18	94,91
Average	5,000383	313,67	8,66	17,32	18	96,24

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0008	449,37	7,46	14,92	19	78,52
L2	5	490,41	8,14	16,28	19	85,67
L3	5,0008	496,36	8,24	16,47	19	86,70
L4	5,0003	490,28	8,14	16,27	19	85,65
L5	4,9998	493,82	8,20	16,39	19	86,27
L6	5,0006	507,43	8,42	16,84	19	88,62
Average	5,000383	487,95	8,10	16,20	19	85,24

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0008	400,80	6,10	12,20	16	76,24
L2	5	419,83	6,39	12,78	16	79,86
L3	5,0008	428,93	6,53	13,05	16	81,57
L4	5,0003	417,10	6,35	12,69	16	79,34
L5	4,9998	421,85	6,42	12,84	16	80,25
L6	5,0006	437,69	6,66	13,32	16	83,24
Average	5,000383	421,04	6,41	12,81	16	80,08

Tabel 3a. TKI Tartu Labor avastamis- ja määramispiir maitseainesegus

Sudaan I

Average	2,33 Stdv %	2,43 LoD=3*Stdv=	0,17 mg/kg
Stdv	0,06	LoQ=10*Stdv=	0,57 mg/kg

Sudaan II

Average	2,06 Stdv %	1,59 LoD=3*Stdv=	0,10 mg/kg
Stdv	0,03	LoQ=10*Stdv=	0,33 mg/kg

Sudaan III

Average	2,09 Stdv %	2,01 LoD=3*Stdv=	0,13 mg/kg
Stdv	0,04	LoQ=10*Stdv=	0,42 mg/kg

Sudaan IV

Average	1,44 Stdv %	2,92 LoD=3*Stdv=	0,13 mg/kg
Stdv	0,04	LoQ=10*Stdv=	0,42 mg/kg

Tabel 3b. TKI Tartu Labor avastamis- ja määramispiir kastmes

Sudaan I

Average	0,424 Stdv %	0,67 LoD=3*Stdv=	0,01 mg/kg
Stdv	0,003	LoQ=10*Stdv=	0,03 mg/kg

Sudaan II

Average	0,384 Stdv %	2,80 LoD=3*Stdv=	0,03 mg/kg
Stdv	0,011	LoQ=10*Stdv=	0,11 mg/kg

Sudaan III

Average	0,455 Stdv %	1,78 LoD=3*Stdv=	0,02 mg/kg
Stdv	0,008	LoQ=10*Stdv=	0,08 mg/kg

Sudaan IV

Average	0,407 Stdv %	1,22 LoD=3*Stdv=	0,01 mg/kg
Stdv	0,005	LoQ=10*Stdv=	0,05 mg/kg

Lisa 13. Tartu Ülikooli KK arvutused

Tabel 4a. Tartu Ülikool KK saagiste arvutused maitseainesegus, kontsentratsioonidel Sudaan I 2,425; Sudaan II 2,25; Sudaan III 2,375 ja Sudaan IV 2,0 mg/kg.

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	11,91	0,24	2,37	2,425	97,67
L2	0,9999	10,69	0,21	2,14	2,425	88,36
L3	1,0001	11,55	0,23	2,30	2,425	94,94
L4	1,0002	11,21	0,22	2,24	2,425	92,36
L5	1,0002	11,57	0,23	2,31	2,425	95,10
L6	1,0001	10,83	0,22	2,17	2,425	89,44
Average	1,0001	11,29	0,23	2,25	2,425	92,98

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	7,31	0,20	2,03	2,25	90,26
L2	0,9999	7,12	0,20	1,98	2,25	88,10
L3	1,0001	7,30	0,20	2,03	2,25	90,13
L4	1,0002	7,67	0,21	2,13	2,25	94,46
L5	1,0002	7,62	0,21	2,11	2,25	93,80
L6	1,0001	7,77	0,22	2,15	2,25	95,58
Average	1,0001	7,46	0,21	2,07	2,25	92,05

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	13,71	0,24	2,40	2,375	101,18
L2	0,9999	14,36	0,25	2,50	2,375	105,25
L3	1,0001	14,23	0,25	2,48	2,375	104,44
L4	1,0002	14,26	0,25	2,48	2,375	104,62
L5	1,0002	15,23	0,26	2,63	2,375	110,64
L6	1,0001	15,75	0,27	2,71	2,375	113,92
Average	1,0001	14,59	0,25	2,53	2,375	106,67

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	7,65	0,13	1,30	2	65,14
L2	0,9999	8,46	0,14	1,41	2	70,58
L3	1,0001	8,53	0,14	1,42	2	71,01
L4	1,0002	9,23	0,15	1,51	2	75,66
L5	1,0002	9,09	0,15	1,49	2	74,73
L6	1,0001	9,41	0,15	1,54	2	76,88
Average	1,0001	8,73	0,14	1,45	2	72,33

Tabel 4b. Tartu Ülikool KK saagiste arvutused maitseainesegus, kontsentratsioonidel
Sudaan I 48,5; Sudaan II 45,0; Sudaan III 47,5 ja Sudaan IV 40,0 mg/kg

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	216,50	4,02	40,20	48,5	82,88
L2	0,9999	213,21	3,96	39,59	48,5	81,64
L3	1,0001	218,17	4,05	40,50	48,5	83,51
L4	1,0002	217,16	4,03	40,31	48,5	83,12
L5	1,0002	217,32	4,04	40,34	48,5	83,18
L6	1,0001	216,83	4,03	40,26	48,5	83,00
Average	1,0001	216,53	4,02	40,20	48,5	82,89

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	149,52	3,86	38,63	45	85,85
L2	0,9999	142,59	3,69	36,85	45	81,90
L3	1,0001	146,93	3,80	37,96	45	84,36
L4	1,0002	149,89	3,87	38,72	45	86,05
L5	1,0002	147,96	3,82	38,22	45	84,94
L6	1,0001	146,79	3,79	37,93	45	84,29
Average	1,0001	147,28	3,81	38,05	45	84,56

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	226,27	3,40	33,96	47,5	71,48
L2	0,9999	209,46	3,15	31,47	47,5	66,24
L3	1,0001	227,38	3,41	34,12	47,5	71,83
L4	1,0002	230,70	3,46	34,61	47,5	72,86
L5	1,0002	231,29	3,47	34,70	47,5	73,04
L6	1,0001	217,13	3,26	32,60	47,5	68,63
Average	1,0001	223,71	3,36	33,57	47,5	70,68

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	1,0001	154,00	2,09	20,87	40	52,16
L2	0,9999	137,39	1,86	18,65	40	46,62
L3	1,0001	157,18	2,13	21,29	40	53,23
L4	1,0002	156,24	2,12	21,16	40	52,91
L5	1,0002	156,68	2,12	21,22	40	53,06
L6	1,0001	138,40	1,88	18,78	40	46,95
Average	1,0001	149,98	2,03	20,33	40	50,82

Tabel 5a. Tartu Ülikool KK saagiste arvutused kastmes, kontsentratsioonidel Sudaan I 0,485; Sudaan II 0,45; Sudaan III 0,475 ja Sudaan IV 0,40 mg/kg.

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	10,89	0,22	0,44	0,485	89,94
L2	5,0002	10,46	0,21	0,42	0,485	86,60
L3	5,0004	10,67	0,21	0,43	0,485	88,20
L4	5,0003	10,52	0,21	0,42	0,485	87,09
L5	5,0006	10,30	0,21	0,41	0,485	85,39
L6	5,0001	10,39	0,21	0,42	0,485	86,06
Average	5,000283	10,54	0,21	0,42	0,485	87,21

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	6,83	0,19	0,38	0,45	84,81
L2	5,0002	6,60	0,19	0,37	0,45	82,23
L3	5,0004	6,76	0,19	0,38	0,45	84,02
L4	5,0003	6,96	0,19	0,39	0,45	86,33
L5	5,0006	6,87	0,19	0,38	0,45	85,31
L6	5,0001	6,58	0,18	0,37	0,45	81,92
Average	5,000283	6,77	0,19	0,38	0,45	84,10

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	12,86	0,23	0,46	0,475	95,86
L2	5,0002	14,29	0,25	0,50	0,475	104,78
L3	5,0004	12,88	0,23	0,46	0,475	95,97
L4	5,0003	12,99	0,23	0,46	0,475	96,69
L5	5,0006	12,82	0,23	0,45	0,475	95,62
L6	5,0001	12,44	0,22	0,44	0,475	93,20
Average	5,0003	13,05	0,23	0,46	0,475	97,02

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	11,11	0,18	0,35	0,4	88,27
L2	5,0002	11,60	0,18	0,37	0,4	91,56
L3	5,0004	10,95	0,17	0,35	0,4	87,21
L4	5,0003	10,74	0,17	0,34	0,4	85,82
L5	5,0006	10,58	0,17	0,34	0,4	84,71
L6	5,0001	10,65	0,17	0,34	0,4	85,17
Average	5,000283	10,94	0,17	0,35	0,4	87,12

Tabel 5b. Tartu Ülikool KK saagise arvutus kastmes, kontsentratsioonidel Sudaan I 19,4; Sudaan II 18,0; Sudaan III 19,0 ja Sudaan IV 16,0 mg/kg.

Sudaan I

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	439,82	8,15	16,30	19,4	84,01
L2	5,0002	484,61	8,98	17,95	19,4	92,55
L3	5,0004	473,93	8,78	17,56	19,4	90,51
L4	5,0003	472,69	8,76	17,51	19,4	90,27
L5	5,0006	468,30	8,68	17,35	19,4	89,43
L6	5,0001	471,11	8,73	17,46	19,4	89,98
Average	5,000283	468,41	8,68	17,35	19,4	89,46

Sudaan II

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	308,71	7,96	15,92	18	88,45
L2	5,0002	341,22	8,80	17,59	18	97,75
L3	5,0004	339,01	8,74	17,48	18	97,11
L4	5,0003	335,27	8,64	17,29	18	96,04
L5	5,0006	332,89	8,58	17,16	18	95,36
L6	5,0001	337,16	8,69	17,39	18	96,59
Average	5,000283	332,38	8,57	17,14	18	95,22

Sudaan III

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	480,54	7,17	14,34	19	75,48
L2	5,0002	526,28	7,85	15,70	19	82,62
L3	5,0004	538,41	8,03	16,06	19	84,52
L4	5,0003	539,56	8,05	16,09	19	84,70
L5	5,0006	548,88	8,19	16,37	19	86,15
L6	5,0001	548,95	8,19	16,37	19	86,17
Average	5,000283	530,44	7,91	15,82	19	83,27

Sudaan IV

Lisamine	Kaalutis	Pindala	Konts. mg/l	konts. mg/kg	lisatud(mg/kg)	Saagis (%)
L1	5,0001	406,75	5,47	10,93	16	68,32
L2	5,0002	428,47	5,76	11,51	16	71,95
L3	5,0004	445,87	5,99	11,98	16	74,86
L4	5,0003	436,11	5,86	11,72	16	73,23
L5	5,0006	435,61	5,85	11,70	16	73,14
L6	5,0001	455,78	6,12	12,24	16	76,52
Average	5,000283	434,76	5,84	11,68	16	73,00

Tabel 6a. Tartu Ülikool KK avastamis- ja määramispiir maitseainesegus

Sudaan I

Average	2,25 Stdv %	3,87 LoD=3*Stdv=	0,26 mg/kg
Stdv	0,09	LoQ=10*Stdv=	0,87 mg/kg

Sudaan II

Average	2,07 Stdv %	3,21 LoD=3*Stdv=	0,20 mg/kg
Stdv	0,07	LoQ=10*Stdv=	0,67 mg/kg

Sudaan III

Average	2,53 Stdv %	4,39 LoD=3*Stdv=	0,33 mg/kg
Stdv	0,11	LoQ=10*Stdv=	1,11 mg/kg

Sudaan IV

Average	1,45 Stdv %	6,00 LoD=3*Stdv=	0,26 mg/kg
Stdv	0,09	LoQ=10*Stdv=	0,87 mg/kg

Tabel 6b. Tartu Ülikool KK avastamis- ja määramispiir kastmes

Sudaan I

Average	0,423 Stdv %	1,88 LoD=3*Stdv=	0,02 mg/kg
Stdv	0,008	LoQ=10*Stdv=	0,08 mg/kg

Sudaan II

Average	0,378 Stdv %	2,07 LoD=3*Stdv=	0,02 mg/kg
Stdv	0,008	LoQ=10*Stdv=	0,08 mg/kg

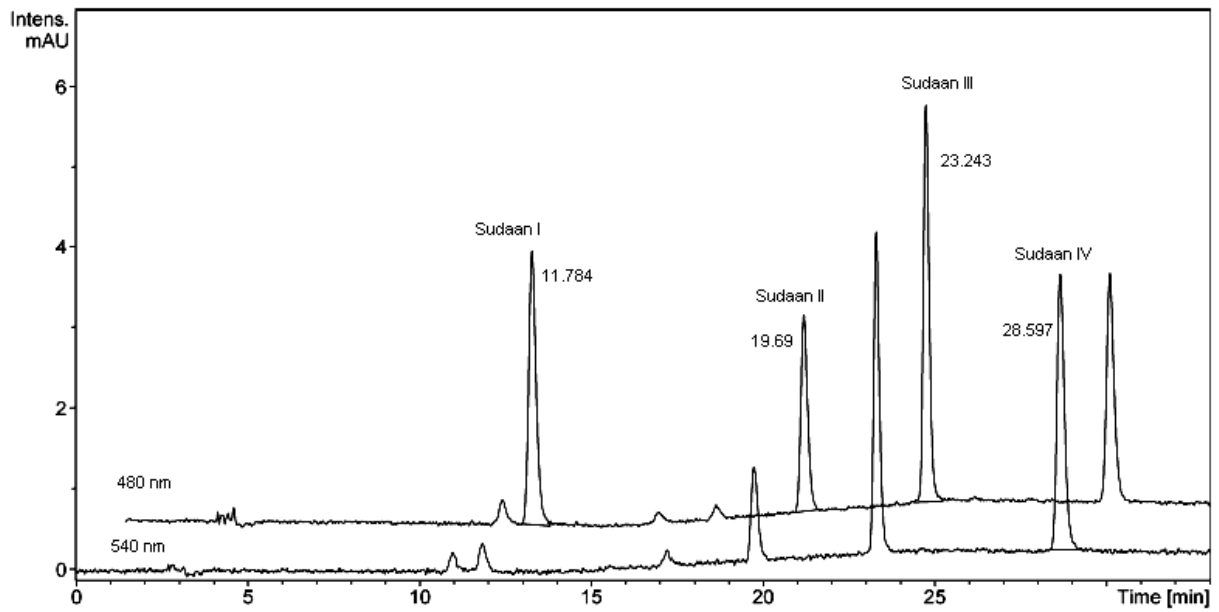
Sudaan III

Average	0,461 Stdv %	4,11 LoD=3*Stdv=	0,06 mg/kg
Stdv	0,019	LoQ=10*Stdv=	0,19 mg/kg

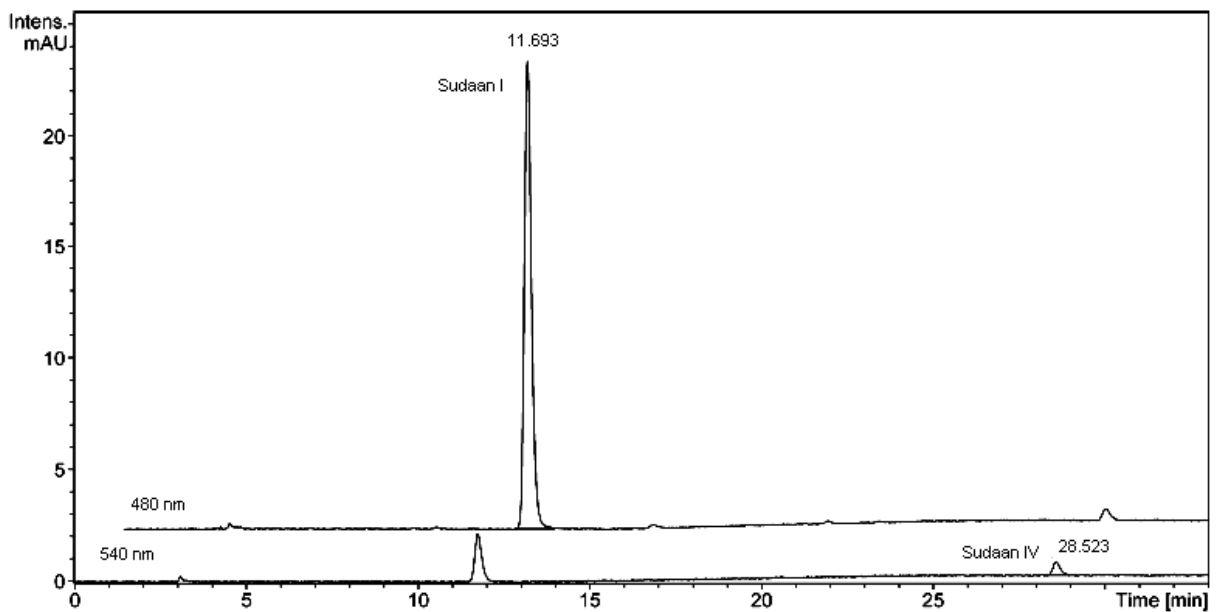
Sudaan IV

Average	0,348 Stdv %	2,92 LoD=3*Stdv=	0,03 mg/kg
Stdv	0,010	LoQ=10*Stdv=	0,10 mg/kg

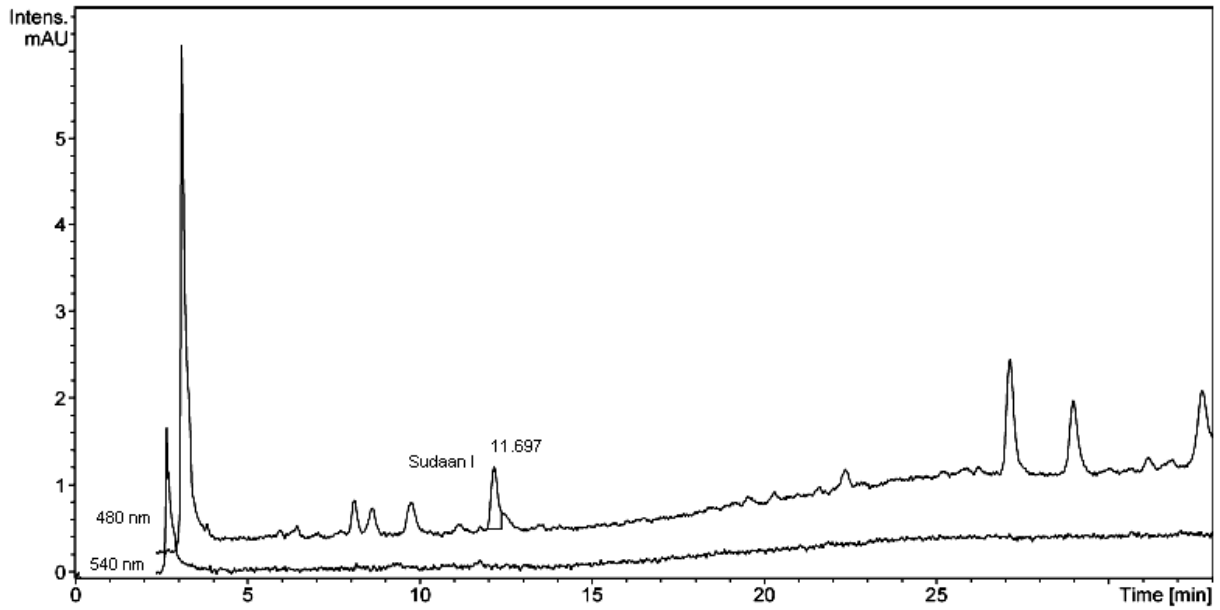
Lisa 14. Standardlahuste ja proovide kromatogrammide



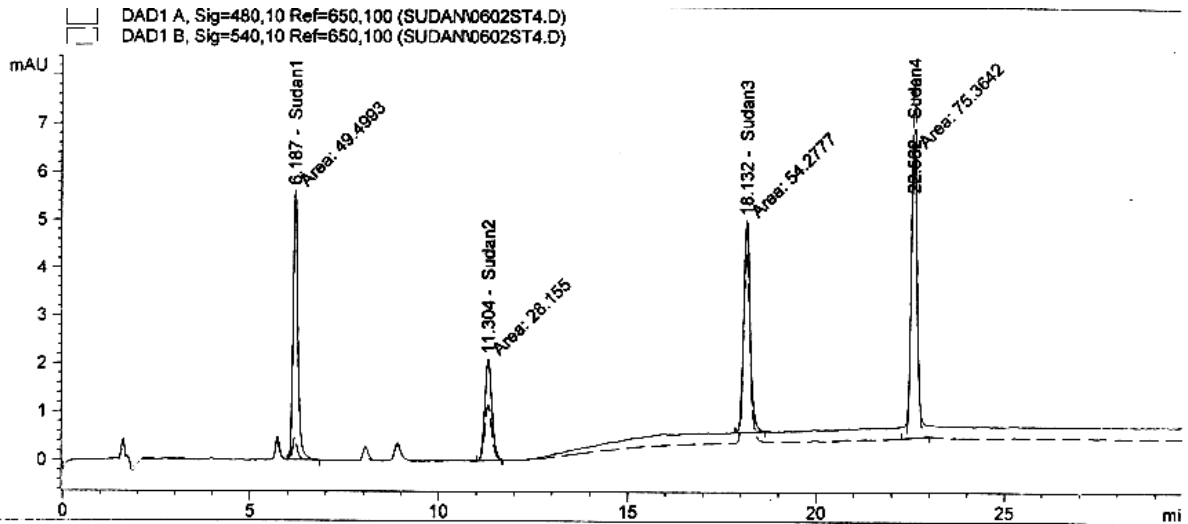
Joonis 1. Sudaan I – IV standardlahus 1,0 mg/l



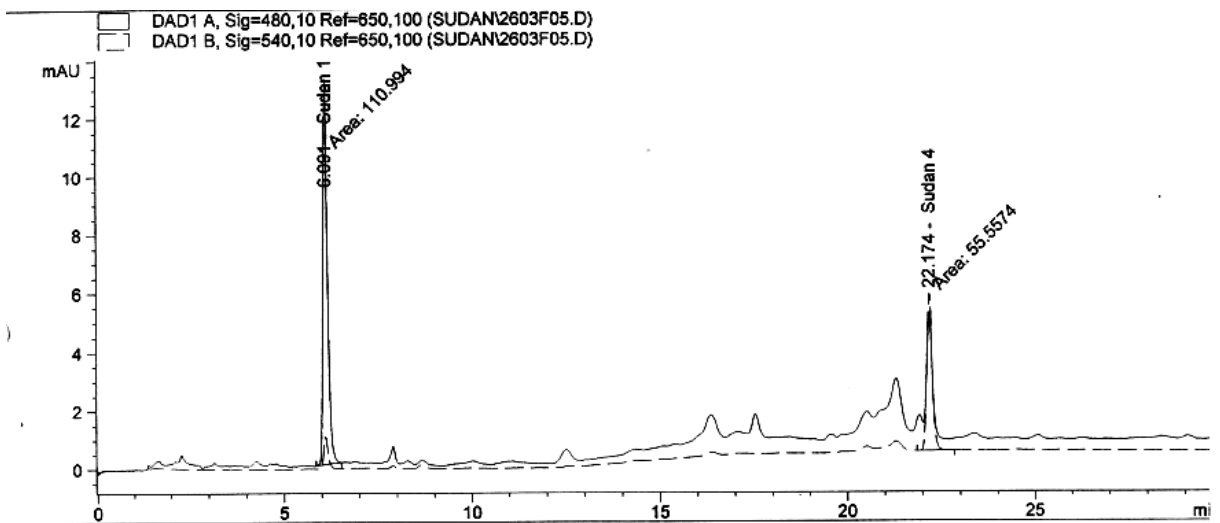
Joonis 2. Maitseainesegu Sudaan I (136,2 mg/kg) ja Sudaan IV (5,2 mg/kg)



Joonis 3. Kaste Sudaan I (0,46 mg/kg)



Joonis 4. Sudaan I – IV standard 1,0 mg/l



Joonis 5. Fapas Sudaan I (27,25 mg/kg) ja Sudaan IV (13,7 mg/kg)

Lisa 15. Mõõtemääramatuse arvutus

Sudaan I määramine vedelikkromatograafiliselt kastmes kontsentratsioonil 19,4mg/kg

ALUS: F. Calibani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, Accurate mass measurements for confirmation of Sudan azo-dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadrupole orthogonal acceleration time of light mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1058 (2004) 127-135.

KASUTUSALA: Käesolevat meetodit kasutatakse rasvlahustuvate sünteetiliste asovärvainete Sudaan I-IV määramiseks maitseaineseades ja kastmetes.

PÕHIMÕTE: Proovidest ekstraheeritakse Sudaan I-IV atsetooniga ning proovid viiakse lõpuks eluenti. Proovides Sudaan I-IV sisaldus määratakse vedelikkromatograafiliselt

Model Equation:

{Põhivõrrand}

$$C = ((A_{\text{proov}} - b_0) / b_1) * L/R;$$

{Kromatograafilised mõõtmised}

eeldame, et kõikide mõõtmiste määramatus koosneb kolmest komponendist (vaatleme seda A_{proovi} näitel):

-korduvuse määramatus ($A_{\text{proov,rep}}$);

-detektori triivist põhjustatud määramatus ($A_{\text{proov,triiv}}$);

-integreerimise ebaoptimaalsusest tingitud määramatus ($A_{\text{proov,int}}$)

{Proovi piigi pindala}

$$A_{\text{proov}} = A_{\text{proov,rep}} + A_{\text{proov,triiv}} + A_{\text{proov,int}};$$

{Kalibreerimisgraafiku piikide pindalad}

$$A_1 = A_{1\text{rep}} + A_{1\text{triiv}} + A_{1\text{int}};$$

$$A_2 = A_{2\text{rep}} + A_{2\text{triiv}} + A_{2\text{int}};$$

$$A_3 = A_{3\text{rep}} + A_{3\text{triiv}} + A_{3\text{int}};$$

$$A_4 = A_{4\text{rep}} + A_{4\text{triiv}} + A_{4\text{int}};$$

$$A_5 = A_{5\text{rep}} + A_{5\text{triiv}} + A_{5\text{int}};$$

$$A_6 = A_{6\text{rep}} + A_{6\text{triiv}} + A_{6\text{int}};$$

{Regressioonisirge võrrandid}

$$\sum AC = C_1 * A_1 + C_2 * A_2 + C_3 * A_3 + C_4 * A_4 + C_5 * A_5 + C_6 * A_6;$$

$$\text{keskC} = (C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5 + C_6) / n;$$

$$\text{keskA} = (A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) / n;$$

$$\sum CC = C_1 * C_1 + C_2 * C_2 + C_3 * C_3 + C_4 * C_4 + C_5 * C_5 + C_6 * C_6;$$

$$b_1 = (\sum AC - n * \text{keskC} * \text{keskA}) / (\sum CC - n * \text{keskC} * \text{keskC});$$

$$b_0 = \text{keskA} - b_1 * \text{keskC};$$

List of Quantities:

Quantity	Unit	Definition
C	mg/kg	värvi kontsentratsioon
A _{proov}	mAU	proovilahuse piigi pindala
b ₀	mAU	regresioonisirge vabaliige
b ₁	mAU*/l/mg	regressioonisirge tõus
L	l/kg	lahjendusfaktor
R	ühikuta	recovery
A _{proov,rep}	mAU	proovilahuse piigi pindala koos korduvusest tingitud määramatuse komponendiga
A _{proov,triiv}	mAU	proovilahuse piigi pindala korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{proov,int}	mAU	proovilahuse piigi pindala ümardamisest tingitud määramatuse komponent
A ₁	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{1,rep}	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{1,triiv}	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{1,int}	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A ₂	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{2,rep}	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{2,triiv}	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{2,int}	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A ₃	mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{3,rep}	mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{3,triiv}	mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{3,int}	mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A ₄	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{4,rep}	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent

Quantity	Unit	Definition
A _{4triiv}	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{4int}	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A ₅	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{5rep}	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{5triiv}	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{5int}	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A ₆	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{6rep}	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{6triiv}	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{6int}	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
ΣAC	mAU*mg/l	abisuurus regressiooni jaoks
C ₁	mg/l	1. kalibreerimilahuse kontsentratsioon
C ₂	mg/l	2. kalibreerimilahuse kontsentratsioon
C ₃	mg/l	3. kalibreerimilahuse kontsentratsioon
C ₄		
C ₅	mg/l	5. kalibreerimilahuse kontsentratsioon
C ₆	mg/l	6. kalibreerimilahuse kontsentratsioon
keskC	mg/l	abisuurus regressiooni jaoks
n	ühikuta	punktide arv regressioonisirgel
keskA	AU	abisuurus regressiooni jaoks
ΣCC	mg ² /l ²	abisuurus regressiooni jaoks

C: Result
A_{proov}: Interim Result
b₀: Interim Result
b₁: Interim Result
L: Type B rectangular distribution
Value: 1.94 l/kg
Halfwidth of Limits: 0.0194 l/kg

R: Type B normal distribution
Value: 0.923 ühikuta
Expanded Uncertainty: 0.0307 ühikuta
Coverage Factor: 1

R määramatus kujutab endast proovi ettevalmistamise määramatust ja sellisena sisaldab ka suuremat osa meetodi summaarsest korratavuse määramatusest. Antud juhul on saagis 92,3% ja saagise standardmääramatus on 3,07%.

A_{proov}rep: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 6

No.	Observation
1	412.46
2	456.32
3	441.96
4	437.89
5	434.92
6	429.23

Arithmetic Mean: 435.46 mAU
Standard Deviation: 15 mAU
Standard Uncertainty: 5.92 mAU
Degrees of Freedom: 5

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{proov}triiv: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 4.35 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{proov}int: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 4.35 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A₁: Interim Result

A_{1rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	1.06827
2	1.15015

Arithmetic Mean: 1.1092 mAU
Standard Deviation: 0.058 mAU
Standard Uncertainty: 0.0409 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{1triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.011 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{1int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.011 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A₂: Interim Result

A_{2rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	2.61128
2	2.53339

Arithmetic Mean: 2.5723 mAU
Standard Deviation: 0.055 mAU
Standard Uncertainty: 0.0389 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{2triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.026 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{2int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.026 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A₃: Interim Result

A_{3rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	11.26932
2	11.36599

Arithmetic Mean: 11.3177 mAU
Standard Deviation: 0.068 mAU
Standard Uncertainty: 0.0483 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes ± 1% pindalast

A_{3triiiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.11 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{3int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.11 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A₄: Interim Result

A_{4rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	92.68539
2	94.89207

Arithmetic Mean: 93.79 mAU
Standard Deviation: 1.6 mAU
Standard Uncertainty: 1.10 mAU
Degrees of Freedom: 1

A_{4triiiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.94 mAU

A_{4int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.94 mAU

A₅: Interim Result

A_{5rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	237.26430
2	235.24008

Arithmetic Mean: 236.25 mAU
Standard Deviation: 1.4 mAU
Standard Uncertainty: 1.01 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{5triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 2.36 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{5sint}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 2.36 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A₆: Interim Result

A_{6rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	472.14389
2	477.84692

Arithmetic Mean: 475.00 mAU
Standard Deviation: 4.0 mAU
Standard Uncertainty: 2.85 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{6triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 4.75 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{6int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 4.75 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

ΣAC: Interim Result

C₁: Type B normal distribution
Value: 0.03125 mg/l
Expanded Uncertainty: 0.0003125 mg/l
Coverage Factor: 1

C₂: Type B normal distribution
Value: 0.0625 mg/l
Expanded Uncertainty: 0.000625 mg/l
Coverage Factor: 1

C₃: Type B normal distribution
Value: 0.25 mg/l
Expanded Uncertainty: 0.0025 mg/l
Coverage Factor: 1

C₄: Type B normal distribution
Value: 2.0
Expanded Uncertainty: 0.02
Coverage Factor: 1

C₅: Type B normal distribution
Value: 5 mg/l
Expanded Uncertainty: 0.05 mg/l
Coverage Factor: 1

C₆: Type B normal distribution
Value: 10 mg/l
Expanded Uncertainty: 0.1 mg/l
Coverage Factor: 1

keskC: Interim Result

n: Constant
Value: 6 ühikuta

keskA: Interim Result

ΣCC: Interim Result

Uncertainty Budget:

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
L	1.9400 l/kg	0.0112 l/kg	rectangular	9.9	0.11 mg/kg	2.2 %
R	0.9230 ühikuta	0.0307 ühikuta	normal	-21	-0.64 mg/kg	72.6 %
A _{proov,rep}	435.46 mAU	5.92 mAU	normal	0.044	0.26 mg/kg	12.1 %
A _{proov,triiv}	0.0 mAU	2.51 mAU	rectangular	0.044	0.11 mg/kg	2.2 %
A _{proov,int}	0.0 mAU	2.51 mAU	rectangular	0.044	0.11 mg/kg	2.2 %
A _{1rep}	1.1092 mAU	0.0409 mAU	normal	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$110 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{1triiv}	0.0 mAU	$6.35 \cdot 10^{-3}$ mAU	rectangular	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$17 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{1int}	0.0 mAU	$6.35 \cdot 10^{-3}$ mAU	rectangular	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$17 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{2rep}	2.5723 mAU	0.0389 mAU	normal	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$100 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{2triiv}	0.0 mAU	0.0150 mAU	rectangular	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$39 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{2int}	0.0 mAU	0.0150 mAU	rectangular	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$39 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{3rep}	11.3177 mAU	0.0483 mAU	normal	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$93 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{3triiv}	0.0 mAU	0.0635 mAU	rectangular	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$120 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{3int}	0.0 mAU	0.0635 mAU	rectangular	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$120 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
A _{4rep}	93.79 mAU	1.10 mAU	normal	$-4.2 \cdot 10^{-3}$	$-4.7 \cdot 10^{-3}$ mg/kg	0.0 %
A _{4triiv}	0.0 mAU	0.543 mAU	rectangular	$-4.2 \cdot 10^{-3}$	$-2.3 \cdot 10^{-3}$ mg/kg	0.0 %
A _{4int}	0.0 mAU	0.543 mAU	rectangular	$-4.2 \cdot 10^{-3}$	$-2.3 \cdot 10^{-3}$ mg/kg	0.0 %
A _{5rep}	236.25 mAU	1.01 mAU	normal	-0.015	-0.015 mg/kg	0.0 %
A _{5triiv}	0.0 mAU	1.36 mAU	rectangular	-0.015	-0.020 mg/kg	0.0 %
A _{5int}	0.0 mAU	1.36 mAU	rectangular	-0.015	-0.020 mg/kg	0.0 %
A _{6rep}	475.00 mAU	2.85 mAU	normal	-0.032	-0.092 mg/kg	1.5 %
A _{6triiv}	0.0 mAU	2.74 mAU	rectangular	-0.032	-0.089 mg/kg	1.4 %
A _{6int}	0.0 mAU	2.74 mAU	rectangular	-0.032	-0.089 mg/kg	1.4 %
C ₁	0.031250 mg/l	$312 \cdot 10^{-6}$ mg/l	normal	-0.13	$-40 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %
C ₂	0.062500 mg/l	$625 \cdot 10^{-6}$ mg/l	normal	-0.12	$-78 \cdot 10^{-6}$ mg/kg	0.0 %

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
C ₃	0.25000 mg/l	2.50·10 ⁻³ mg/l	normal	-0.092	-230·10 ⁻⁶ mg/kg	0.0 %
C ₄	2.0000	0.0200	normal	0.20	4.1·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
C ₅	5.0000 mg/l	0.0500 mg/l	normal	0.71	0.035 mg/kg	0.2 %
C ₆	10.000 mg/l	0.100 mg/l	normal	1.5	0.15 mg/kg	4.2 %
n	6.0 ühikuta					
C	19.290 mg/kg	0.754 mg/kg				

Result: Quantity: C
Value: 19.3 mg/kg
Expanded Uncertainty: ±1.5 mg/kg
Coverage Factor: 2.00
Coverage: manual

Sudaan III määramine vedelikkromatograafiliselt kastmes kontsentratsioonil 47,5 mg/kg (valgusest tingitud efekt)

ALUS: F. Calibani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, Accurate mass measurements for confirmation of Sudan azo-dyes in hot chilli products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadrupole orthogonal acceleration time of light mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1058 (2004) 127-135.

KASUTUSALA: Käesolevat meetodit kasutatakse rasvlahustuvate sünteetiliste asovärvainete Sudaan I-IV määramiseks maitseainesegudes ja kastmetes.

PÕHIMÕTE: Proovidest ekstraheeritakse Sudaan I-IV atsetooniga ning proovid viiakse lõpuks eluenti. Proovides Sudaan I-IV sisaldus määratakse vedelikkromatograafiliselt

Model Equation:

{Põhivõrrand}

$$C = ((A_{\text{proov}} - b_0) / b_1) * L / R;$$

{Kromatograafilised mõõtmised}

eeldame, et kõikide mõõtmiste määramatus koosneb kolmest komponendist (vaatleme seda A_{proovi} näitel):

-korduvuse määramatus ($A_{\text{proov,rep}}$);

-detektori triivist põhjustatud määramatus ($A_{\text{proov,triiv}}$);

-integreerimise ebaoptimaalsusest tingitud määramatus ($A_{\text{proov,int}}$)}

{Proovi piigi pindala}

$$A_{\text{proov}} = A_{\text{proov,rep}} + A_{\text{proov,triiv}} + A_{\text{proov,int}} + A_v;$$

{Kalibreerimisgraafiku piikide pindalad}

$$A_1 = A_{1\text{rep}} + A_{1\text{triiv}} + A_{1\text{int}} + A_{1v};$$

$$A_2 = A_{2\text{rep}} + A_{2\text{triiv}} + A_{2\text{int}} + A_{2v};$$

$$A_3 = A_{3\text{rep}} + A_{3\text{triiv}} + A_{3\text{int}} + A_{3v};$$

$$A_4 = A_{4\text{rep}} + A_{4\text{triiv}} + A_{4\text{int}} + A_{4v};$$

$$A_5 = A_{5\text{rep}} + A_{5\text{triiv}} + A_{5\text{int}} + A_{5v};$$

$$A_6 = A_{6\text{rep}} + A_{6\text{triiv}} + A_{6\text{int}} + A_{6v};$$

{Regressioonisirge võrrandid}

$$\sum AC = C_1 * A_1 + C_2 * A_2 + C_3 * A_3 + C_4 * A_4 + C_5 * A_5 + C_6 * A_6;$$

$$\text{keskC} = (C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5 + C_6) / n;$$

$$\text{keskA} = (A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) / n;$$

$$\sum CC = C_1 * C_1 + C_2 * C_2 + C_3 * C_3 + C_4 * C_4 + C_5 * C_5 + C_6 * C_6;$$

$$b_1 = (\sum AC - n * \text{keskC} * \text{keskA}) / (\sum CC - n * \text{keskC} * \text{keskC});$$

$$b_0 = \text{keskA} - b_1 * \text{keskC};$$

List of Quantities:

Quantity	Unit	Definition
C	mg/kg	värvi kontsentratsioon
A _{proov}	mAU	proovilahuse piigi pindala
b ₀	mAU	regressioonisirge vabaliige
b ₁	mAU*/l/mg	regressioonisirge tõus
L	l/kg	lahjendusfaktor
R	ühikuta	recovery
A _{proov,rep}	mAU	proovilahuse piigi pindala koos korduvusest tingitud määramatuse komponendiga
A _{proov,triiv}	mAU	proovilahuse piigi pindala korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{proov,int}	mAU	proovilahuse piigi pindala ümardamisest tingitud määramatuse komponent
A _v	mAU	proovilahuse piigi pindala valgusest tingitud määramatuse komponent
A ₁	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{1,rep}	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{1,triiv}	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{1,int}	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A _{1,v}	mAU	1. kalibreerimislahuse piigi pindala valgusest tingitud määramatuse komponent
A ₂	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{2,rep}	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{2,triiv}	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{2,int}	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A _{2,v}	mAU	2. kalibreerimislahuse piigi pindala valgusest tingitud määramatuse komponent
A ₃ A _{3,rep}	mAU mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala 3. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{3,triiv}	mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{3,int}	mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A _{3,v}	mAU	3. kalibreerimislahuse piigi pindala valgusest tingitud määramatuse komponent

Sudaan III määramine vedelikkromatograafiliselt kastmes kontsentratsioonil
47,5 mg/kg (valgusest tingitud efekt)

Quantity	Unit	Definition
A ₄	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{4rep}	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{4triiv}	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{4int}	mAU	4. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A _{4v}	mAU	4.kalibreerimislahuse piigi pindala valgusest tingitud määramatuse komponent
A ₅	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{5rep}	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{5triiv}	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{5int}	mAU	5. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A _{5v}	mAU	5.kalibreerimislahuse piigi pindala valgusest tingitud määramatuse komponent
A ₆	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala
A _{6rep}	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala väärtus koos korduvusest tingitud määramatuse komponent
A _{6triiv}	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala trivist tingitud määramatuse komponent
A _{6int}	mAU	6. kalibreerimislahuse piigi pindala integreerimisest tingitud määramatuse komponent
A _{6v}	mAU	6.kalibreerimislahuse piigi pindala valgusest tingitud määramatuse komponent
ΣAC	mAU*mg/l	abisuurus regressiooni jaoks
C ₁	mg/l	1. kalibreerimislahuse kontsentratsioon
C ₂	mg/l	2. kalibreerimislahuse kontsentratsioon
C ₃	mg/l	3. kalibreerimislahuse kontsentratsioon
C ₄	mg/l	4. kalibreerimislahuse kontsentratsioon
C ₅	mg/l	5. kalibreerimislahuse kontsentratsioon
C ₆	mg/l	6. kalibreerimislahuse kontsentratsioon
keskC	mg/l	abisuurus regressiooni jaoks
n	ühikuta	punktide arv regressioonisirgel
keskA	AU	abisuurus regressiooni jaoks
ΣCC	mg ² /l ²	abisuurus regressiooni jaoks

C: Result

A_{proov}: Interim Result

Date: 05/14/2007

File: Sud3m

Page 3 of 11

b₀: Interim Result
b₁: Interim Result
L: Type B rectangular distribution
Value: 9.5 l/kg
Halfwidth of Limits: 0.095 l/kg
R: Type B normal distribution
Value: 0.707 ühikuta
Expanded Uncertainty: 0.0269 ühikuta
Coverage Factor: 1

R määramatus kujutab endast proovi ettevalmistamise määramatust ja sellisena sisaldab ka suuremat osa meetodi summaarsest korratavuse määramatusest. Antud juhul on saagis 70,7% ja saagise standardmääramatus on 2,69%.

A_{proov}rep: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 6

No.	Observation
1	226.27
2	209.46
3	227.38
4	230.70
5	231.29
6	217.13

Arithmetic Mean: 223.70 mAU
Standard Deviation: 8.6 mAU
Standard Uncertainty: 3.52 mAU
Degrees of Freedom: 5

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes ± 1% pindalast

A_{proov}triiv: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 2.24 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{proov}int: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 2.24 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A_v: Type B rectangular distribution
Value: 0
Halfwidth of Limits: 26.2

Valgusest tingitud määramatus 11,7 %

A₁: Interim Result

A_{1rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	1.6148
2	1.59678

Arithmetic Mean: 1.60579 mAU
Standard Deviation: 0.013 mAU
Standard Uncertainty: $9.01 \cdot 10^{-3}$ mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{1triiiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.016 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{1int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.016 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A_{1v}: Type B rectangular distribution
Value: 0
Halfwidth of Limits: 0.117

Valgusest tingitud määramatus on 11,7 %

A₂: Interim Result

A_{2rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	3.16241
2	3.05987

Arithmetic Mean: 3.1111 mAU
Standard Deviation: 0.073 mAU
Standard Uncertainty: 0.0513 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{2triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.031 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{2int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.031 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A_{2v}: Type B rectangular distribution
Value: 0
Halfwidth of Limits: 0.117

Valgusest tingitud määramatus on 11,7 %

A₃: Interim Result

A_{3rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	14.26104
2	13.99874

Arithmetic Mean: 14.130 mAU
Standard Deviation: 0.19 mAU
Standard Uncertainty: 0.131 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes ± 1% pindalast

A_{3triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.14 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{3int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 0.14 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A_{3v}: Type B rectangular distribution
Value: 0
Halfwidth of Limits: 0.117

Valgusest tingitud määramatus on 11,7 %

A₄: Interim Result

A_{4rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	122.10596
2	121.87003

Arithmetic Mean: 121.988 mAU
Standard Deviation: 0.17 mAU
Standard Uncertainty: 0.118 mAU
Degrees of Freedom: 1

A_{4triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 1.22 mAU

A_{4int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 1.22 mAU

A_{4v}: Type B rectangular distribution
Value: 0
Halfwidth of Limits: 0.117

Valgusest tingitud määramatus on 11,7 %

A₅: Interim Result

A_{5rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	308.87805
2	307.85706

Arithmetic Mean: 308.368 mAU
Standard Deviation: 0.72 mAU
Standard Uncertainty: 0.510 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes ± 1% pindalast

A_{5triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 3.08 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{5int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 3.08 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A_{5v}: Type B rectangular distribution
Value: 0
Halfwidth of Limits: 0.117

Valgusest tingitud määramatus on 11,7 %

A₆: Interim Result

A_{6rep}: Type A
Method of observation: Direct
Number of observations: 2

No.	Observation
1	640.74762
2	641.21002

Arithmetic Mean: 640.979 mAU
Standard Deviation: 0.33 mAU
Standard Uncertainty: 0.231 mAU
Degrees of Freedom: 1

Eeldatakse, et pindala korduvuse määramatus on umbes $\pm 1\%$ pindalast

A_{6triiv}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 6.41 mAU

Eeldatakse, et triivist tingitud määramatuspole üle 1% pindalast

A_{6int}: Type B rectangular distribution
Value: 0 mAU
Halfwidth of Limits: 6.41 mAU

Eeldatakse, et integreerimisest tingitud määramatus on 1% pindalast

A_{6v}: Type B rectangular distribution
Value: 0
Halfwidth of Limits: 0.117

Valgusest tingitud määramatus on 11,7 %

Σ AC: Interim Result

C₁: Type B normal distribution
Value: 0.03125 mg/l
Expanded Uncertainty: 0.0003125 mg/l
Coverage Factor: 1

Sudaan III määramine vedelikkromatograafiliselt kastmes kontsentratsioonil 47,5 mg/kg (valgusest tingitud efekt)		
C₂:	Type B normal distribution Value: 0.0625 mg/l Expanded Uncertainty: 0.000625 mg/l Coverage Factor: 1	
C₃:	Type B normal distribution Value: 0.25 mg/l Expanded Uncertainty: 0.0025 mg/l Coverage Factor: 1	
C₄:	Type B normal distribution Value: 2.0 Expanded Uncertainty: 0.02 Coverage Factor: 1	
C₅:	Type B normal distribution Value: 5 mg/l Expanded Uncertainty: 0.05 mg/l Coverage Factor: 1	
C₆:	Type B normal distribution Value: 10 mg/l Expanded Uncertainty: 0.1 mg/l Coverage Factor: 1	
keskC:	Interim Result	
n:	Constant Value: 6 ühikuta	
keskA:	Interim Result	
ΣCC:	Interim Result	
Date: 05/14/2007	File: Sud3m	Page 9 of 11

Uncertainty Budget:

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
L	9.5000 l/kg	0.0548 l/kg	rectangular	5.0	0.28 mg/kg	0.5 %
R	0.7070 ühikuta	0.0269 ühikuta	normal	-68	-1.8 mg/kg	23.0 %
A _{proov,rep}	223.70 mAU	3.52 mAU	normal	0.21	0.74 mg/kg	3.8 %
A _{proov,triiv}	0.0 mAU	1.29 mAU	rectangular	0.21	0.27 mg/kg	0.5 %
A _{proov,int}	0.0 mAU	1.29 mAU	rectangular	0.21	0.27 mg/kg	0.5 %
A _v	0.0	15.1	rectangular	0.21	3.2 mg/kg	70.4 %
A _{1rep}	1.60579 mAU	9.01·10 ⁻³ mAU	normal	-0.030	-270·10 ⁻⁶ mg/kg	0.0 %
A _{1triiv}	0.0 mAU	9.24·10 ⁻³ mAU	rectangular	-0.030	-280·10 ⁻⁶ mg/kg	0.0 %
A _{1int}	0.0 mAU	9.24·10 ⁻³ mAU	rectangular	-0.030	-280·10 ⁻⁶ mg/kg	0.0 %
A _{1v}	0.0	0.0675	rectangular	-0.030	-2.0·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{2rep}	3.1111 mAU	0.0513 mAU	normal	-0.030	-1.5·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{2triiv}	0.0 mAU	0.0179 mAU	rectangular	-0.030	-540·10 ⁻⁶ mg/kg	0.0 %
A _{2int}	0.0 mAU	0.0179 mAU	rectangular	-0.030	-540·10 ⁻⁶ mg/kg	0.0 %
A _{2v}	0.0	0.0675	rectangular	-0.030	-2.0·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{3rep}	14.130 mAU	0.131 mAU	normal	-0.030	-4.0·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{3triiv}	0.0 mAU	0.0808 mAU	rectangular	-0.030	-2.5·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{3int}	0.0 mAU	0.0808 mAU	rectangular	-0.030	-2.5·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{3v}	0.0	0.0675	rectangular	-0.030	-2.1·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{4rep}	121.988 mAU	0.118 mAU	normal	-0.033	-3.9·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{4triiv}	0.0 mAU	0.704 mAU	rectangular	-0.033	-0.024 mg/kg	0.0 %
A _{4int}	0.0 mAU	0.704 mAU	rectangular	-0.033	-0.024 mg/kg	0.0 %
A _{4v}	0.0	0.0675	rectangular	-0.033	-2.3·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{5rep}	308.368 mAU	0.510 mAU	normal	-0.039	-0.020 mg/kg	0.0 %

Quantity	Value	Standard Uncertainty	Distribution	Sensitivity Coefficient	Uncertainty Contribution	Index
A _{5triiv}	0.0 mAU	1.78 mAU	rectangular	-0.039	-0.069 mg/kg	0.0 %
A _{5int}	0.0 mAU	1.78 mAU	rectangular	-0.039	-0.069 mg/kg	0.0 %
A _{5v}	0.0	0.0675	rectangular	-0.039	-2.6·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
A _{6rep}	640.979 mAU	0.231 mAU	normal	-0.047	-0.011 mg/kg	0.0 %
A _{6triiv}	0.0 mAU	3.70 mAU	rectangular	-0.047	-0.18 mg/kg	0.2 %
A _{6int}	0.0 mAU	3.70 mAU	rectangular	-0.047	-0.18 mg/kg	0.2 %
A _{6v}	0.0	0.0675	rectangular	-0.047	-3.2·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
C ₁	0.031250 mg/l	312·10 ⁻⁶ mg/l	normal	1.9	600·10 ⁻⁶ mg/kg	0.0 %
C ₂	0.062500 mg/l	625·10 ⁻⁶ mg/l	normal	1.9	1.2·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
C ₃	0.25000 mg/l	2.50·10 ⁻³ mg/l	normal	1.9	4.9·10 ⁻³ mg/kg	0.0 %
C ₄	2.0000	0.0200	normal	2.1	0.043 mg/kg	0.0 %
C ₅	5.0000 mg/l	0.0500 mg/l	normal	2.5	0.12 mg/kg	0.1 %
C ₆	10.000 mg/l	0.100 mg/l	normal	3.0	0.30 mg/kg	0.6 %
n	6.0 ühikuta					
C	47.67 mg/kg	3.79 mg/kg				

Result: Quantity: C
Value: 47.7 mg/kg
Expanded Uncertainty: ±7.6 mg/kg
Coverage Factor: 2.00
Coverage: manual