Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пропилентиомочевины в луке-репке, ботве и клубнях картофеля, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3406—16

Издание официальное

Москва • 2017

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пропилентиомочевины в луке-репке, ботве и клубнях картофеля, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3406—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств пропилентиомочевины в луке-репке, ботве и клубнях картофеля, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.— М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—12 с.

ISBN 978—5—7508—1549—4

1. Разработаны сотрудниками ФГБНУ «Всероссийский НИИ защиты растений» и ООО «Инновационный центр защиты растений» (В. И. Долженко, И. А. Цибульская, А. С. Комарова, Т. Д. Черменская).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 22 декабря 2016 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 29 декабря 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Карташева

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 11.09.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75
Тираж 125 экз. Заказ 55

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

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
29 декабря 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пропилентиомочевины в луке-репке, ботве и клубнях картофеля, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3406—16

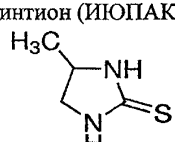
Свидетельство о метрологической аттестации № 01.5.04.232/01.00043/2016.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации пропилентиомочевины в луке-репке, клубнях картофеля, томатах и томатном соке, яблоках и яблочном соке в диапазоне концентраций 0,01—0,1 мг/кг, в ботве картофеля в диапазоне концентраций 0,1—1,0 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Пропилентиомочевина

4-Метил-2-имидазолидинтион (ИЮПАК)



Брутто формула: $C_4H_8N_2S$.

Молекулярная масса: 116,2.

Пропилентиомочевина является основным метаболитом при деградации пропинеба.

Белое кристаллическое вещество без запаха.

Растворима в ацетонитриле и метаноле.

K_{ow} logP = 0,26 (20 °С); константа Генри $8 \cdot 10^{-8}$ Па·м^3/моль (20 °С).

Период полураспада в почве: DT_{50} (20 °С, аэробные условия) 2,1 день.

Гигиенические нормативы для пропилентиомочевины в России не установлены.

1. Погрешность измерений

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и ее составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не превышает значений, приведенных в таблице 1, для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности* (границы относительной погрешности ($P = 0,95$), $\pm\delta$, %	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях), R, % ($P = 0,95$)
Ботва картофеля	0,1—1,0	25	10	13	28	36
Клубни картофеля	0,01—0,1	25	10	13	28	36
Лук-репка	0,01—0,1	25	10	13	28	36
Томаты	0,01—0,1	25	10	13	28	36
Томатный сок	0,01—0,1	25	10	13	28	36
Яблоки	0,01—0,1	25	10	13	28	36
Яблочный сок	0,01—0,1	25	10	13	28	36
* Соответствует расширенной неопределенности $U_{отн.}$ (в относительных единицах) при коэффициенте охвата $k = 2$						

Таблица 2

Полнота извлечения пропилентиомочевины, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для $n = 20$, $P = 0,95$

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Полнота извлечения, %	Стандартное отклонение, %	Доверительный интервал среднего результата, ± %
Ботва картофеля	0,1	0,1—1,0	79,6	3,14	1,38
Клубни картофеля	0,01	0,01—0,1	80,3	2,97	1,30
Лук-репка	0,01	0,01—0,1	79,6	3,40	1,49
Томаты	0,01	0,01—0,1	82,0	3,29	1,44
Томатный сок	0,01	0,01—0,1	83,7	4,82	2,11
Яблоки	0,01	0,01—0,1	83,2	4,87	2,13
Яблочный сок	0,01	0,01—0,1	80,2	3,96	1,73

2. Метод измерений

Метод основан на определении пропилентиомочевины методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового (УФ) детектора после извлечения из образцов водным метанолом и последующей очистки с использованием окиси алюминия.

Идентификация пропилентиомочевины проводится по времени удерживания, количественное определение – методом абсолютной калибровки.

Избирательность метода обеспечивается сочетанием условий подготовки проб и хроматографирования.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с УФ-детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки

Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 150 г, предел допустимой погрешности 5 мг

Весы лабораторные аналитические, наибольший предел взвешивания 81/210 г, предел допустимой погрешности 0,1/0,3 мг

Колбы мерные на 10, 100 $см^3$ ГОСТ 23932—90

Микродозаторы одноканальные переменного объема от 100 до 1 000 мм^3 и от 1 до 5 см^3	
Цилиндры мерные на 50 и 100 см^3	ГОСТ 23932—90

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

3.2. Реактивы

Алюминия окись для хроматографии, ч, нейтральный, 100—200 мкм	
Ацетонитрил для ВЭЖХ	ТУ 2634-002-04715285—12
Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная, деионизованная)	ГОСТ Р 52501—05
Кислота ортофосфорная 98 %, хч	ГОСТ 6552—80
Метанол, хч	ГОСТ 6995—77
Пропилентиомочевина с содержанием основного вещества 95,6 %	
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрила и 0,005 М H_3PO_4 в соотношении 1 : 99	

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией, не требующих дополнительной очистки растворителей.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Аналитическая колонка, заполненная сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, (100 × 2,1) мм, 1,7 мкм	
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 50 и 100 см^3	ГОСТ 9737—93
Пробирки полипропиленовые центрифужные с крышками объемом 50 см^3	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Ультразвуковая ванна с рабочей частотой 37 кГц	
Устройство перемешивающее (50—200 колебаний в минуту)	ТУ 4389-007-44330709—11
Центрифуга со скоростью вращения 4 000 об./мин	

Примечание. Допускается применение оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ

12.1.007—76, требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и ГН 2.2.5.2308—07.

Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—15.

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист-химик, владеющий методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, имеющий опыт работы, ознакомленный с руководством по эксплуатации хроматографа, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

6. Условия измерений

При выполнении измерений выполняют следующие условия:

– процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;

– выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к определению

7.1. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа аналитическую колонку кондиционируют в потоке подвижной фазы (0,1—0,2 $см^3$/мин) до стабилизации нулевой линии.

7.2. Приготовление растворов

7.2.1. 0,005 М раствор ортофосфорной кислоты: (0,5 ± 0,01) г 98%-й ортофосфорной кислоты помещают в мерную колбу объемом 1 $дм^3$, растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до метки.

7.2.2. Для приготовления *75%-го водного метанола*, в мерную колбу объемом 1 $дм^3$ помещают 750 мл метанола и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

7.2.3. Для приготовления *подвижной фазы* смешивают ацетонитрил с 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты в соотношении 1 : 99 по объему, используя мерные цилиндры.

7.3. Приготовление основного и градуировочных растворов

7.3.1. Основной раствор с концентрацией 0,5 мг/см^3: точную навеску пропилентиомочевины (50 ± 0,5 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом.

7.3.2. Приготовление градуировочных растворов

Градуировочные растворы с концентрациями пропилентиомочевины 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 готовят методом последовательного разбавления по объему, используя 0,005 М раствор ортофосфорной кислоты.

7.3.2.1. Раствор № 1 с концентрацией 1,0 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 0,2 см^3 основного раствора и доводят до метки 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты.

7.3.2.2. Раствор № 2 с концентрацией 0,5 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 5 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты.

7.3.2.3. Раствор № 3 с концентрацией 0,2 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 2 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты.

7.3.2.4. Раствор № 4 с концентрацией 0,1 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 1 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты.

7.3.2.5. Раствор № 5 с концентрацией 0,05 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты.

Основной раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0—4 °С в течение 7 дней, градуировочные растворы использовать в день приготовления.

При изучении полноты определения пропилентиомочевины используют растворы вещества, приготовленные из основного раствора методом последовательного разбавления по объему 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты.

7.4. Построение градуировочного графика

Для установления градуировочной характеристики (площадь пика – концентрация пропилентиомочевины в растворе) в хроматограф вводят по 10 мм^3 градуировочных растворов (не менее 3 параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4 точек по диапазону измеряемых концентраций). Затем измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации пропилентиомочевины в градуировочном растворе.

Методом наименьших квадратов рассчитывают градуировочный коэффициент (K) в уравнении линейной регрессии:

$C = KS$, где

S – площадь пика градуировочного раствора.

Градуировку признают удовлетворительной, если значение коэффициента линейной корреляции оказывается не ниже 0,99.

Градуировочную характеристику необходимо проверять при замене реактивов, хроматографической колонки или элементов хроматографической системы, а также при отрицательном результате контроля градуировочного коэффициента.

Градуировочную зависимость признают стабильной при выполнении следующего условия:

$$\frac{|C - C_K|}{C} \cdot 100 \le \lambda_{контр.}, \text{ где}$$

C – аттестованное значение массовой концентрации пропилентиомочевины в градуировочном растворе;

C_K – результат контрольного измерения массовой концентрации пропилентиомочевины в градуировочном растворе;

$\lambda_{контр.}$ – норматив контроля градуировочного коэффициента, % ($\lambda_{контр.} = 10$ % при $P = 0{,}95$).

8. Отбор проб и хранение

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79), а также в соответствии с ГОСТ Р 51783—01 «Лук репчатый свежий, реализуемый в розничной торговой сети. Технические условия»; ГОСТ 7194—81 «Картофель свежий. Правила приемки и методы определения качества»; ГОСТ 1725—85 «Томаты свежие. Технические условия»; ГОСТ 27572—87 «Яблоки свежие для промышленной переработки». Пробы овощей хранят до анализа в герметичной полиэтиленовой упаковке в морозильной камере при –18 °С в течение 6 месяцев. Перед анализом пробы измельчают, не размораживая. Пробы яблок хранят до анализа в герметично закрытом двойном полиэтиленовом пакете в морозильной камере при температуре не выше –18 °С в течение 6 месяцев. Пробы яблочного и томатного сока хранят в холодильнике при температуре 0—4 °С в стеклянной таре с притертой пробкой в течение недели.

9. Проведение определения

9.1. Определение пропилентиомочевины в ботве и клубнях картофеля, луке-репке, плодах томата и яблок

Навеску исследуемого материала 20 г помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку, добавляют 50 см^3 75%-го водного мета-

нола и экстрагируют в ультразвуковой ванне 10 мин. Растворитель декантируют и экстракцию повторяют еще с 50 см^3 75%-го водного метанола. 35 см^3 объединенного экстракта переносят в чистую пробирку и добавляют 10 см^3 окиси алюминия. Пробирку помещают в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируют при 4 000 об./мин 10 мин. После этого отбирают 25 см^3 экстракта (аликвота, соответствующая 5 г) в круглодонную колбу и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см^3 подвижной фазы и 10 мм^3 вводят в хроматограф.

Пробы ботвы растворяют в 10 см^3 подвижной фазы и 10 мм^3 вводят в хроматограф.

9.2. Определение пропилентиомочевины в томатном и яблочном соках

Из представительной пробы сока отбирают 10 г и переносят в пробирку с 3 см^3 окиси алюминия. Пробирку помещают в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируют при 4 000 об./мин 10 мин. После чего отбирают 5 см^3 (аликвота, соответствующая 5 г) в круглодонную колбу и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см^3 подвижной фазы и 10 мм^3 вводят в хроматограф.

9.3. Условия хроматографирования

Ультраэффективный жидкостный хроматограф с УФ-детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки. Аналитическая колонка, заполненная сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, (100 × 2,1) мм, 1,7 мкм. Температура колонки (30 ± 1) °С. Подвижная фаза: ацетонитрил и 0,005 М ортофосфорная кислота в соотношении 1 : 99. Скорость потока элюента: 0,2 см^3/мин. Рабочая длина волны УФ-детектора 233 нм. Объем вводимой пробы 10 мм^3. Время удерживания пропилентиомочевины (3,7 ± 0,1) мин.

10. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки. Содержание пропилентиомочевины в пробе (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = S_x \cdot K \cdot \frac{V}{P}, \text{ где}$$

S_x – площадь пика пропилентиомочевины на хроматограмме испытуемого образца, (AU);

K – градуировочный коэффициент, найденный на стадии построения соответствующей градуировочной зависимости;

V – объем пробы, подготовленной для хроматографического анализа, см^3;

P – навеска анализируемого образца, г.

Содержание остаточных количеств пропилентиомочевины в образце вычисляют как среднее из двух параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор пропилентиомочевины с концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости:

$$\frac{2\cdot|X_1 - X_2|\cdot 100}{X_1 + X_2} \le r, \text{ где}$$

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;

r – значение предела повторяемости ($r = 2{,}8\sigma_r$).

При невыполнении условия выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$(\bar{X} \pm \Delta)$, мг/кг при вероятности $P = 0{,}95$, где

$\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

$$\Delta = \frac{\delta\cdot\bar{X}}{100}, \text{ где}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

В случае если содержание компонента меньше нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«*содержание вещества в пробе менее нижней границы определения*» (например: менее 0,01 мг/кг, где 0,01 мг/кг – предел обнаружения пропилентиомочевины в луке).

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Стабильность результатов измерений контролируют перед проведением измерений, анализируя один из градуировочных растворов.

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится с применением метода добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д = \Delta_{л,X} + \Delta_{л,X'}, \text{ где}$$

$\pm \Delta_{л,X}$ ($\pm \Delta_{л,X'}$) – характеристика погрешности (абсолютная погрешность) результатов анализа, соответствующая содержанию компонента в испытуемом образце (расчетному значению содержания компонента в образце с добавкой соответственно), мг/кг, при этом:

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta, \text{ где}$$

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \bar{X}}{100}, \text{ где}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \bar{X}' - \bar{X} - C_д, \text{ где}$$

$\bar{X}'$, $\bar{X}$, $C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки соответственно, мг/кг.

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л,X'} + \Delta^2_{л,X}} \qquad (1)$$

Проводят сопоставление результата контроля процедуры ($K_к$) с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (2) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (2) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры к их устранению.

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предел воспроизводимости (R):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{X_1 + X_2} \le R, \text{ где} \qquad (3)$$

X_1, X_2 – результаты измерений в двух разных лабораториях, мг/кг;

R – предел воспроизводимости (в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.