Государственное санитарно-эпидемнологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств 2,4-Д кислоты в молоке, яйцах и субпродуктах млекопитающих хроматографическими методами

Методические указания
МУК 4.1.3440—17

Издание официальное

Москва • 2017

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств 2,4-Д кислоты в молоке, яйцах и субпродуктах млекопитающих хроматографическими методами

Методические указания
МУК 4.1.3440—17

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств 2,4-Д кислоты в молоке, яйцах и субпродуктах млекопитающих хроматографическими методами: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—22 с.

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (В. Н. Ракитский, Н. Е. Федорова, О. Е. Егорченкова, В. В. Баюшева, М. В. Ларькина, Л. П. Мухина, М. В. Егорова, Л. Г. Бондарева, Д. Н. Соболев).

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 13 марта 2017 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

© 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
13 марта 2017 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств 2,4-Д кислоты в молоке, яйцах и субпродуктах млекопитающих хроматографическими методами

Методические указания МУК 4.1.3440—17

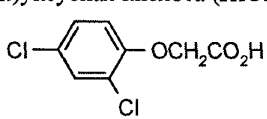
Свидетельство об аттестации № РОСС RU.0001.310430/0274.22.09.16.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения методов высокоэффективной жидкостной и капиллярной газожидкостной хроматографии для измерения концентраций 2,4-Д кислоты (далее – 2,4-Д) в молоке, яйцах в диапазоне 0,005—0,05 мг/кг; в субпродуктах млекопитающих (печени, почках) в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

2,4-Д

(2,4-дихлорфенокси)уксусная кислота (ИЮПАК)



$C_8H_6Cl_2O_3$

Молекулярная масса: 221,0.

Бесцветное кристаллическое вещество со слабым фенольным запахом. Температура плавления: 140 °С. Давление паров: $1{,}86 \times 10^{-2}$ МПа (25 °С). Плотность 0,7—0,8. Коэффициент распределения октанол/вода: $K_{ow}\log P = 2{,}58$—2,83 (pH 1); 0,04—0,33 (pH 5). Растворимость в воде (мг/дм^3, 25 °С): 311 (pH 1), 20 031 (pH 5), 23 180 (pH 7), 34 196 (pH 9). Растворимость в органических растворителях (г/кг, 20 °С): этанол – 1 250; диэтиловый эфир – 243; гептан – 1,1; толуол – 6,7; ксилол – 5,8. 2,4-Д является сильной кислотой, образует водорастворимые соли со щелочными металлами и аминами. При нормальных условиях вещество стабильно к окислению и гидролизу, устойчиво в кислой и щелочной

средах. Константа кислотности pKa – 2,73. Устойчивость к фотолизу: DT_{50} – 7,5 дня.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – 639—764 мг/кг, для мышей – 138 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 1 600 мг/кг; кроликов > 2 400 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 1,79 мг/дм^3 воздуха (24 часа).

Область применения. 2,4-Д – селективный системный гербицид, эффективно подавляющий рост и развитие большинства двудольных широколистных сорных растений, рекомендуется к применению на зерновых культурах (пшеница яровая и озимая, ячмень, кукуруза).

МДУ в молоке и яйцах – 0,01 мг/кг, субпродуктах млекопитающих – 5,0 мг/кг.

1. Погрешность измерений

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

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для всего диапазона измерений ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, %, $P = 0,95$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %		Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное 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, %	
			ВЭЖХ	ГЖХ	ВЭЖХ	ГЖХ	ВЭЖХ	ГЖХ	ВЭЖХ	ГЖХ
молоко	от 0,005 до 0,05 вкл.	50	4,7	2,8	6,5	4,0	13	8	18	11
яйца	от 0,005 до 0,05 вкл.	50	4,9	2,2	6,8	3,0	14	6	19	9
печень	от 0,05 до 0,5 вкл.	50	2,8	3,7	3,9	5,2	8	10	11	15
почки	от 0,05 до 0,5 вкл.	50	2,4	1,9	3,4	2,7	7	5	9	8

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0.95$, $n = 20$							
	нижний предел количественного определения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	полнота извлечения вещества, %		стандартное отклонение, %		доверительный интервал среднего результата, ±, %	
			ВЭЖХ	ГЖХ	ВЭЖХ	ГЖХ	ВЭЖХ	ГЖХ
молоко	0.005	0.005—0,05	88,2	92,2	9,2	6,0	4.8	3,1
яйца	0.005	0,005—0,05	93,4	87,2	11.4	6.6	5,9	3,5
печень	0,05	0,05—0,5	85,3	93,7	9,4	4.8	4.9	2,5
почки	0.05	0.05—0.5	85,3	92.9	7,9	3.4	4,1	1,8

2. Метод измерений

Метод основан на определении 2,4-Д с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе с тройным квадрупольным масс-детектором в режиме мультиреакционного мониторинга и капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с масс-селективным детектором (МСД) или детектором электронного захвата ионов (ДЭЗ).

Экстракцию вещества из анализируемых проб выполняют ацетонитрилом, содержащим 1 % уксусной кислоты, с использованием смеси солей для экстракции (смесь сульфата магния и хлорида натрия), очистку экстрактов проводят методом дисперсионной твердофазной экстракции с применением смеси сорбентов на основе амина, октадецилсилана и графитизированной сажи.

Газохроматографическому измерению предшествует стадия дериватизации вещества в метиловый эфир.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст. и с пределом допустимой погрешности ± 1,5 мм рт. ст.

Весы аналитические с пределом взвешивания 110 г и пределом допустимой погрешности 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 420 г и пределом допустимой погрешности ± 0,01 г	ГОСТ Р 53228—08
Газовый хроматограф, снабженный электронно-захватным детектором с пределом детектирования по линдану $3,5 \times 10^{-14}$ г/с, масс-селективным детектором, предназначенный для работы с капиллярными колонками	
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %	
Жидкостный хроматограф с тандемным масс-спектрометрическим детектором: тройной квадруполь, снабженный автоматическим пробоотборником и термостатом колонки	
Колбы мерные 2-го класса точности, вместимостью 50,100 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ OIML R 111-1—09
Микрошприц, вместимостью 10 $мм^3$	
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Термометр с диапазоном измерений от 0 до 55 °С и ценой деления 0,1 °С	ГОСТ 28498—90
Цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

2,4-Д, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,3 %	
Азот газообразный нулевой, в баллонах	ТУ 6-21-39—96
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-14-2167—84
Ацетон, осч	ГОСТ 2603—79
Гелий газообразный, вч, в баллонах	ТУ 0271-001-45905715—02
н-Гексан (гексан), для хроматографии	ТУ 6-09-06-657—84
Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная или деионизованная)	ГОСТ Р 52501—05

Калий марганцовокислый (перманганат калия), хч	ГОСТ 20490—75
Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч, прокаленный	ГОСТ 4221—76
Калия гидроокись (гидроксид калия), гранулированный, хч	ГОСТ 24363—80
Кислота серная, концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Магний сернокислый (сульфат магния), безводный хч	ГОСТ 4523—77
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Метиламин гидрохлорид, ч	ТУ 6-09-3755—74
Мочевина, чда	ГОСТ 6691—77
Натрий сернокислый (сульфат) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий азотистокислый (нитрит натрия), хч	ГОСТ 4197—74
Натрий хлористый (хлорид натрия), хч	ГОСТ 4233—77
N-нитрозо-N-метилмочевина	
Пропанол-1 (н-пропанол), хч	ГОСТ 9805—84
Сорбент для твердофазной экстракции на основе силикагеля с привитыми пропиламинными группами: $(CH_2)_3NH_2$, площадь поверхности ~570 $м^2/г$, средний размер пор 67 А, средний размер частиц 60 мкм	
Сорбент для твердофазной экстракции на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами $(CH_2)_{17}CH_3$ (С18), площадь поверхности ~547 $м^2/г$, средний размер пор 64 А, средний размер частиц 58 мкм	
Графитизированная сажа, специфическая площадь поверхности ~100 $м^2/г$, размер частиц 120/400 меш	
Силикагель для колоночной хроматографии (размер частиц 160—400 меш)	
Уксусная кислота, ледяная, хч	ГОСТ 61—75
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора), хч	ГОСТ 22300—76
Эфир диэтиловый (этиловый эфир), чда	ТУ 2600-001-43852015—02

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Баня водяная	
Банка с крышкой из полипропилена, вместимостью 100 см^3	
Воронки химические стеклянные конусные	ГОСТ 25336—82
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Груша резиновая	ТУ 9398-005-0576-9082—03
Гомогенизатор бытовой	
Керамические гомогенизаторы для пробирок на 50 см^3	
Колбы круглодонные на шлифе (для упаривания) вместимостью 50, 150, 250 и 1 000 см^3	ГОСТ 9737—93
Колбы плоскодонные конические вместимостью 100 см^3	ГОСТ 25336—82
Лед	
Мешалка магнитная	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Пробирки полипропиленовые центрифужные с крышками, вместимостью 50 и 2 см^3	
Пробирки со шлифом вместимостью 5 см^3	
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	ГОСТ 25336—82
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающий вакуум до 10 мбар	
Склянки из темного стекла	
Стаканы химические с носиком вместимостью 2 дм^3	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Фильтры мембранные для фильтрации проб с помощью шприца, размер пор 0,22 мкм	
Центрифуга лабораторная роторная, скорость вращения до 4 000 об./мин с центрифужными стаканами на 10 и 100 см^3	
Шприцы медицинские одноразовые вместимостью 2 см^3	ГОСТ 24861—91

Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 мм^3

Примечание. Допускается использование вспомогательных устройств и материалов 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 Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на газовый и жидкостный хроматографы.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности 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—90.

4.3. При работе с газами, находящимися в баллонах под давлением до 15 МПа (150 кгс/см^2), необходимо соблюдать федеральные нормы и правила в области промышленной безопасности «Правила промышленной безопасности опасных производственных объектов, на которых используется оборудование, работающее под избыточным давлением» (утв. Приказом Ростехнадзора от 25.03.2014 № 116). Запрещается открывать вентиль баллона, не установив в нем понижающий редуктор.

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист, имеющий опыт работы на газовом и жидкостном хроматографах, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормам контроля погрешности измерений.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают 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 газовом и жидкостном хроматографах проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, градуировочных растворов, растворов внесения, получение N-нитрозо-N-метилмочевины (при необходимости) и раствора диазометана, смеси растворителей для растворения проб (метод ВЭЖХ), установление градуировочных характеристик, отбор проб.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетон

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия и прокаленным карбонатом калия или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30.

7.1.2. Ацетонитрил

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора (на 1 дм^3 ацетонитрила 20 г пентоксида фосфора) не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия (на 1 дм^3 ацетонитрила 10 г карбоната калия).

7.1.3. н-Гексан

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.2. Приготовление раствора уксусной кислоты в ацетонитриле с объемной долей 1 % (1%-й раствор)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 300—400 см^3 ацетонитрила, вносят 10 см^3 ледяной уксусной кислоты, перемешивают, доводят ацетонитрилом до метки, вновь перемешивают. Раствор хранят в темном месте (в емкости из темного стекла) не более 14 дней.

7.3. Приготовление компонентов подвижной фазы для ВЭЖХ

7.3.1. Компонент А: 0,04%-й раствор уксусной кислоты в воде. В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 300—400 см^3 деиони-

зированной воды, вносят 0,4 см^3 уксусной кислоты, доводят деионизированной водой до метки, перемешивают.

7.3.2. Компонент В: ацетонитрил.

7.4. Приготовление раствора гидроксида калия с массовой долей 40 % (40%-й раствор)

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают (20 ± 0,1) г гидроксида калия, растворяют в 25—30 см^3 дистиллированной воды, доводят водой до метки. Раствор хранят в банке из полипропилена не более 1 месяца.

7.5. Получение N-нитрозо-N-метилмочевины

В отсутствии коммерческого препарата N-нитрозо-N-метилмочевины осуществляют его синтез.

Все работы необходимо проводить в вытяжном шкафу!

В круглодонную колбу на шлифе вместимостью 1 дм^3, снабженную обратным холодильником, помещают 80 г метиламина гидрохлорида и 300 г мочевины, растворяют содержимое в 400 см^3 воды и кипятят 3 часа с обратным холодильником на водяной бане. Раствор в колбе охлаждают до комнатной температуры и добавляют в него 110 г нитрита натрия, охлаждают в бане со льдом, содержащим хлорид натрия, до 0 °С и медленно при перемешивании вливают в смесь 600 г льда и 60 см^3 концентрированной серной кислоты, помещенную в стакан вместимостью 2 дм^3, охлаждаемый снаружи смесью льда с хлоридом натрия. Выпавшие кристаллы нитрозометилмочевины немедленно отфильтровывают на воронке Бюхнера, хорошо отсасывают под вакуумом и промывают на фильтре ледяной водой.

Внимание! N-нитрозо-N-метилмочевину хранят в темной склянке в холодильнике, так как под действием света и тепла она может взорваться.

7.6. Получение раствора диазометана

Диазометан взрывоопасен и очень ядовит. Все работы необходимо проводить в вытяжном шкафу!

В коническую колбу на 100 см^3 вносят 20 см^3 40%-го раствора гидроксида калия и 50 см^3 диэтилового эфира, колбу помещают в баню со льдом и охлаждают до температуры 2—5 °С. В охлажденную смесь порциями при перемешивании на магнитной мешалке или путем встряхивания вносят 5 г N-нитрозо-N-метилмочевины. Реакционную смесь выдерживают на холоду 10 мин. Затем эфирный слой сливают в чистую коническую колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 10—15 гранул

гидроксида калия и колбу оставляют в бане со льдом на 2,5—3 часа для осушения раствора.

Раствор диазометана в эфире годен к употреблению при хранении в холодильнике в течение 1—2 суток. При хранении сосуды с диазометаном нельзя плотно закрывать!

7.7. Приготовление градуировочных растворов и раствора внесения

7.7.1. Серия № 1 (метод ВЭЖХ)

7.7.1.1. Исходный раствор 2,4-Д для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3) В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,01 ± 0,0001) г 2,4-Д, растворяют в 50—70 см^3 метанола, доводят метанолом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение 6 месяцев.

7.7.1.2. Рабочий раствор № 1 2,4-Д для градуировки и внесения (концентрация 1 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1,0 см^3 исходного градуировочного раствора с концентрацией 100,0 мкг/см^3 (п. 7.7.1.1), доводят до метки метанолом, тщательно перемешивают, получают рабочий раствор № 1 с концентрацией 2,4-Д 1,0 мкг/см^3.

Раствор хранят в холодильнике при температуре 4—6 °С в течение месяца.

Этот раствор используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения действующего вещества методом «внесено-найдено» и контроля качества результатов измерений методом добавок.

7.7.1.3. Рабочие растворы № 2—6 2,4-Д для градуировки (концентрации 0,005—0,1 мкг/см^3). В 5 мерных колб вместимостью 100 см^3 помещают по 0,5; 1,0, 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора № 1 с концентрацией 1,0 мкг/см^3 (п. 7.7.1.2), доводят до метки метанолом, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—6 с концентрацией 2,4-Д 0,005; 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике при температуре (4 ± 2) °С в течение одной недели.

7.7.2. Серия № 2 (метод ГЖХ)

7.7.2.1. Исходный раствор 2,4-Д для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (0,01 ± 0,0001) г 2,4-Д, растворяют в 50—60 см^3 ацетона, доводят ацетоном до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение 6 месяцев.

7.7.2.2. Исходный раствор метилового эфира 2,4-Д для градуировки (концентрация 2,4-Д 1,0 мкг/см^3). В круглодонную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 1,0 см^3 исходного раствора вещества с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.7.2.1), растворитель отдувают потоком теплого воздуха, вносят 3 см^3 раствора диазометана, выдерживают 30 мин при комнатной температуре. Для освобождения от избытка диазометана вносят в колбу 0,1 г силикагеля, выдерживают еще 15 мин. Затем добавляют в колбу 0,1 см^3 н-пропанола, отдувают растворитель потоком теплого воздуха (не помещая колбу на подогретую водяную баню) до влажного остатка. Вносят в колбу 1 см^3 гексана и вновь отдувают растворитель до влажного остатка (отсутствие запаха эфира).

Остаток растворяют в гексане, перенося порциями растворителя по 10—15 см^3 в мерную колбу на 100 см^3, доводят объем до метки, перемешивают.

Раствор метилового эфира 2,4-Д с концентрацией 1 мкг/см^3 хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение месяца.

Растворы № 2—6 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходных растворов.

7.7.2.3. Рабочие растворы № 2–6 метилового эфира 2,4-Д для градуировки (концентрация 2,4-Д 0,005—0,1 мкг/см^3). В 5 мерных колб вместимостью 100 см^3 помещают по 0,5; 1,0, 2,0, 5,0 и 10 см^3 исходного раствора метилового эфира 2,4-Д (приготовленного по п. 7.7.2.2), доводят до метки гексаном, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—6 с концентрацией 2,4-Д 0,005; 0,01; 0,02, 0,05 и 0,1 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение 14 дней.

7.7.2.4. Раствор 2,4-Д для внесения (концентрация 1 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1,0 см^3 исходного раствора, приготовленного по п. 7.7.2.1, разбавляют ацетоном до метки.

Раствор хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение месяца.

Этот раствор используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения веществ методом «внесено-найдено», а также контроле точности измерений методом добавок.

7.8. Кондиционирование хроматографической колонки для ВЭЖХ

Промывают колонку подвижной фазой (смесь компонентов А и Б, приготовленных по п. 7.3, в соотношении 1 : 1) при скорости подачи растворителя 0,3 $см^3$/мин до установления стабильной базовой линии.

7.9. Приготовление смеси солей для экстракции

Для приготовления одного набора смеси солей для экстракции смешивают (4 ± 0,01) г магния сернокислого и (1 ± 0,01) г натрия хлористого, до использования хранят в герметичной упаковке (не более 6 месяцев).

Примечание. Возможно использование других наборов солей для экстракции проб пищевых продуктов и продовольственного сырья массой 10 г.

7.10. Приготовление смеси сорбентов для очистки экстрактов

Для приготовления одного набора смеси сорбентов для очистки экстрактов в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью 2 $см^3$ помещают (50 ± 4) мг сорбента для твердофазной экстракции на основе первичного-вторичного амина, (50 ± 4) мг графитизированной сажи, (150 ± 4) мг магния сернокислого и 50 г ± 4 мг твердофазного сорбента на основе октадецилсилана, закрывают герметично крышкой, встряхивают для перемешивания, хранят не более 6 месяцев.

Примечание. Возможно использование дисперсионных наборов для пищевых продуктов и продовольственного сырья, помещенных в полипропиленовые пробирки вместимостью 2 $см^3$.

7.11. Установление градуировочных характеристик

Градуировочные характеристики, выражающие линейную (с угловым коэффициентом) зависимость площади пика от концентрации 2,4-Д в растворе, устанавливают методом абсолютной калибровки по 5 растворам для градуировки № 2—6 (серии 1, 2) соответственно.

В инжектор жидкостного хроматографа вводят по 2 $мм^3$ каждого градуировочного раствора, приготовленного по п. 7.7.1.3, и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4.1, в испаритель газового хроматографа – по 1 $мм^3$ каждого градуировочного раствора, приготовленного по п. 7.7.2.3, и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4.2.1 или 9.4.2.2. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений. Устанавливают площади пиков веществ, на основании которых строят градуировочные зависимости.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб осуществлен в соответствии с ГОСТ 26809.1—14 «Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу. Часть 1», ГОСТ 31450—13 «Молоко питьевое. Технические условия»; ГОСТ 31654—12 «Яйца куриные пищевые. Технические условия»; ГОСТ 32244—13 «Субпродукты мясные обработанные. Технические условия».

Пробы молока хранят при температуре (4 ± 2) °С не более одной недели. Пробы яиц хранят при температуре (4 ± 2) °С не более месяца, субпродуктов (печени и почек) не более суток. Для длительного хранения пробы замораживают и хранят при температуре –18 °С.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

Образец молока, взбитых яиц, измельченных проб субпродуктов (печень, почки) массой 10 г помещают в центрифужную полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3. Вносят 10 см^3 1%-го раствора уксусной кислоты в ацетонитриле, помещают в пробирку керамический гомогенизатор, закрывают крышку и интенсивно встряхивают вручную 30 с, вносят в пробирку смесь солей для экстракции (приготовленную по п. 7.9), закрывают крышкой и интенсивно встряхивают (в ручную) в течение 1 мин. Затем пробу центрифугируют в течение 5 мин при скорости вращения 3 500 об./мин и подвергают очистке с применением дисперсионной твердофазной экстракции по п. 9.2.

9.2. Очистка экстракта

Надосадочную жидкость (верхний слой в пробирке после центрифугирования) объемом 1,5—1,8 см^3 с помощью пипетки переносят в пропиленовую центрифужную пробирку, содержащую смесь сорбентов, приготовленную по п. 7.10. Закрывают крышку и интенсивно встряхивают вручную в течение 30 с. Центрифугируют 5 мин при скорости вращения 3 500 об./мин и помещают в морозильник на 15—20 мин. Отбирают с помощью медицинского шприца раствор, фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм), помещают в автосамплер хроматографа для анализа методом ВЭЖХ по п. 9.4.1. При анализе проб печени и почек аликвоту экстракта объемом 1 см^3 дополнительно разбавляют до 10 см^3 1%-м раствором уксусной кислоты в ацетонитриле.

Для анализа методом ГЖХ 1 см^3 отфильтрованного через мембранный фильтр раствора упаривают на ротационном вакуумном испа-

рителе при температуре бани не выше 35 °С почти досуха, оставшийся растворитель отдувают потоком теплого воздуха. Для освобождения от следов воды в колбу вносят 4—5 $см^3$ ацетонитрила, вновь упаривают и подвергают дериватизации по п. 9.3.

9.3. Дериватизация

К сухому остатку в колбе, полученному по п. 9.2, добавляют 3 $см^3$ раствора диазометана, выдерживают 30 минут при комнатной температуре. Для освобождения от избытка диазометана вносят в колбу 0,1 г силикагеля, выдерживают еще 15 минут. Затем добавляют 0,1 $см^3$ н-пропанола, отдувают растворитель потоком теплого воздуха (не помещая колбу на подогретую водяную баню) до влажного остатка. Добавляют в колбу 1 $см^3$ н-гексана и вновь отдувают растворитель до влажного остатка (отсутствие запаха эфира).

Остаток растворяют в 1 $см^3$ гексана, тщательно перемешивают и анализируют при условиях хроматографирования, указанных в п. 9.4.2.1 или 9.4.2.2.

При анализе проб печени и почек сухой остаток растворяют в 10 $см^3$ гексана.

Пробу вводят в испаритель хроматографов не менее двух раз. Устанавливают площади пиков 2,4-Д (ВЭЖХ) и метилового эфира 2,4-Д (ГЖХ), с помощью градуировочных графиков определяют концентрацию вещества в хроматографируемом растворе.

9.4. Условия хроматографирования

9.4.1. Метод ВЭЖХ

Жидкостный хроматограф с тандемным масс-спектрометрическим детектором: тройной квадруполь с источником ионизации, оснащенным соосной подачей горячего азота для эффективной десольвации ионов.

Источник ионизации: электростатическое распыление.

Режим работы: регистрация дочерних отрицательных ионов после разрушения материнских ионов (регистрация «перехода»).

Материнский ион (масса/заряд): 219,0.

Дочерние ионы (масса/заряд): 161,0 (количественный расчет), 125,1.

Напряжение на фрагментаторе, В: 76.

Энергия разрушения (соударения), В: 9 (219,0→161,0), 25 (219,0→125,1).

Скорость сканирования: 200 мс.

Давление на распылителе: 35 *psi*.

Скорость осушающего газа 1 (азот): 10 $дм^3$/мин.

Температура газа 1: 325 °С.

Скорость газа 2 (азот): 12 $дм^3$/мин.

Температура газа 2: 400 °С.

Температура квадруполей (1 и 3): 100 °С.

Хроматографическая колонка стальная длиной 50 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, зернением 1,8 мкм.

Температура колонки: 30 °С.

Скорость потока элюента: 0,3 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы: 2 $мм^3$.

Подвижная фаза: ацетонитрил (компонент Б)–0,04%-я уксусная кислота в воде (компонент А).

Режим элюирования

Время, мин	Компонент А, %	Компонент Б, %
0	100	0
1	60	40
2	40	60
3	0	100
4	0	100
6	100	0

Линейный диапазон детектирования 0,01—0,2 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор 2,4-Д с концентрацией 0,1 мкг/$см^3$, разбавляют ацетонитрилом, содержащим 1 % уксусной кислоты (не более чем в 50 раз).

9.4.2. Метод ГЖХ

9.4.2.1. Газовый хроматограф, снабженный масс-селективным детектором, автоматическим пробоотборником, предназначенный для работы с капиллярной колонкой.

Хроматографическая капиллярная кварцевая колонка длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, содержащая сорбент: 5 % – фенил-, 95 % – диметилполисилоксан (толщина пленки сорбента 0,25 мкм).

Температура детектора: квадруполя – 150 °С, источника – 230 °С, переходной камеры – 280 °С.

Температура испарителя: 250 °С.

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 120 °С, выдержка 2 минуты, нагрев колонки со скоро-

стью 8 градусов в минуту до температуры 180 °С, выдержка 3 мин, нагрев колонки со скоростью 20 градусов в минуту до температуры 260 °С, выдержка 5 мин.

Газ 1 (гелий): поток в колонке 1,0 $см^3$/мин.

Давление – 12,58 *psi*.

Средняя линейная скорость – 36,3 см/с.

Хроматографируемый объем: 1 $мм^3$.

Режим регистрации индивидуальных ионов:

– отношение масса-заряд: 199 (количественный), 175, 234.

Линейный диапазон детектирования: 0,005—0,1 нг.

9.4.2.2. Газовый хроматограф, снабженный электронно-захватным детектором, автоматическим пробоотборником, предназначенный для работы с капиллярной колонкой (альтернативный метод).

Хроматографическая капиллярная кварцевая колонка длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм, содержащая сорбент: 14 % – цианпропилфенил, 86 % – диметилполисилоксан (толщина пленки сорбента 0,25 мкм).

Температура детектора: 300 °С.

Температура испарителя: 260 °С.

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 110 °С, выдержка 2 мин, нагрев колонки со скоростью 10 градусов в минуту до температуры 180 °С, выдержка 5 мин, нагрев колонки со скоростью 20 градусов в минуту до температуры 240 °С, выдержка 10 мин.

Газ-носитель – азот, поток 2,0 $см^3$/мин, средняя линейная скорость: 38 см/с, давление 11,2 *psi*.

Хроматографируемый объем: 1 $мм^3$.

Линейный диапазон детектирования: 0,005—0,1 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор метилового эфира 2,4-Д с концентрацией 0,1 мкг/$см^3$, разбавляют гексаном, не более чем в 50 раз.

10. Обработка результатов анализа

Содержание 2,4-Д в пробе (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V}{m}, \text{ где}$$

X – содержание 2,4-Д в пробе, мг/кг;

A – концентрация 2,4-Д, найденная по градуировочной характеристике в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см^3;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3 (V = 1 (молоко, яйца); V = 10 (печень, почки);

m – масса (объем) анализируемого образца, г.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

$$\frac{2\cdot|X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}\cdot 100 \le r, \text{ где} \qquad (1)$$

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

r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8\sigma_r$.

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«*содержание 2,4-Д в пробе молока, яиц – менее 0,005 мг/кг; в пробе печени, почек – менее 0,05 мг/кг*»*.

* 0,005 мг/кг; 0,05 мг/кг – нижние пределы количественного определения в пробе молока, яиц; печени, почек соответственно.

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. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале и по окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее двух образцов концентраций для градуировки, содержание 2,4-Д (ВЭЖХ) или метилового эфира 2,4-Д (ГЖХ) в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,005 до 0,1 мкг/см^3.

Градуировочная характеристика считается стабильной, если для каждого используемого для контроля градуировочного раствора сохраняется соотношение:

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq B \text{, где}$$

X – концентрация 2,4-Д в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора 2,4-Д (ВЭЖХ) или метилового эфира 2,4-Д (ГЖХ), взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

B – норматив контроля погрешности градуировочной характеристики, % (B = 10 % при P = 0,95).

Если величина расхождения (А) превышает 10 %, делают вывод о невозможности применения градуировочной характеристики для дальнейших измерений. В этом случае выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики и повторяют контроль ее стабильности с использованием других градуировочных растворов 2,4-Д или метилового эфира 2,4-Д, предусмотренных МИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.11.

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

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится методом добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

$\pm\Delta_{л,\bar{X}}$ ($\pm\Delta_{л,\bar{X}'}$) – 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:

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

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:

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л,\bar{X}'} + \Delta^2_{л,\bar{X}}}$$

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (1)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (1) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (1) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

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

Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

X_1, X_2 – результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг;

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

Определение остаточных количеств 2,4-Д кислоты в молоке, яйцах и субпродуктах млекопитающих хроматографическими методами

Методические указания
МУК 4.1.3440—17

Ответственный за выпуск Н. В. Карташева

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

Подписано в печать 09.10.17

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,5

Тираж 125 экз. Заказ

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

gost.e-ecolog.ru