Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств фенпироксимата в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3322—15

Издание официальное

Москва • 2016

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 фенпироксимата в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3322—15

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств фенпироксимата в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—12 с.

ISBN 978—5—7508—1469—5

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

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 17 декабря 2015 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 28 декабря 2015 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редакторы Н. В. Кожока, Ю. А. Паршина
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 5.08.16

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 125 экз. Заказ 56

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, 2016
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
28 декабря 2015 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств фенпироксимата в ботве и корнеплодах сахарной свеклы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3322—15

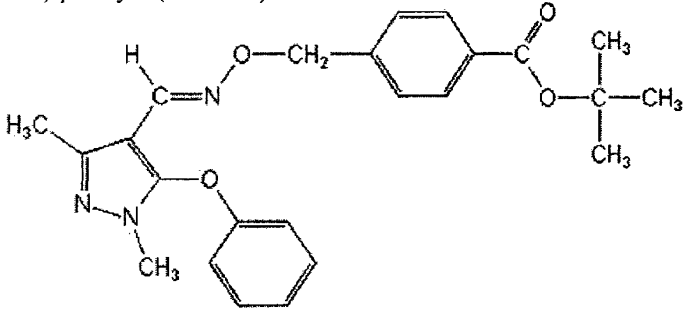
Свидетельство о метрологической аттестации № 01.5.04.197/01.00043/2015 от 08.06.2015.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения остаточных количеств фенпироксимата в диапазонах: в корнеплодах 0,05—0,5 мг/кг, в ботве 0,1—1,0 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Фенпироксимат

трет-Бутил (*E*)-α-(1,3-диметил-5-феноксипиразол-4-ил-метиленаминоокси)-р-толуат (ИЮПАК).



Эмпирическая формула: $C_{24}H_{27}N_3O_4$.
Молекулярная масса: 421,5.

Химически чистое вещество представляет собой белый кристаллический порошок.

Температура плавления: 99,0–102 °С.

Давление пара при 25 °С: 0,0074 мПа.

Растворимость: в воде 0,02 мг/л (при 20 °С), в хлороформе 1179, дихлорметане 1 307, метаноле 15, ацетоне 150 (г/л, при 25 °С).

Стабильность: стабилен в кислых и щелочных средах.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность LD_{50} для крыс 245—480 мг/кг, острая дермальная токсичность LD_{50} для крыс превышает 2 000 мг/кг. Не ирритант. Ингаляционная токсичность LC_{50} (4 часа) для крыс 0,33—0,36 мг/л воздуха. Класс опасности по ВОЗ II. Не токсичен для пчел.

Область применения препарата: активен в отношении многих видов фитофаговых клещей на плодовых и цитрусовых культурах, обладает ларвицидной, нимфацидной и имагоцидной активностью. Не фитотоксичен.

Гигиенические нормативы для фенпироксимата в России: МДУ – соя (бобы, масло), виноград, плодовые семечковые – 0,3 мг/кг.

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 табл. 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 (среднеквадратическое отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (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, полученными в разных лабораториях), R, % ($P = 0,95$)
Ботва свеклы	0,1—1,0	22	7	11	20	31
Корнеплоды свеклы	0,05—0,5	22	7	11	20	31
* соответствует расширенной неопределенности $U_{отн.}$ при коэффициенте охвата $k = 2$						

Таблица 2

Полнота извлечения фенпироксимата, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел количественного определения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	полнота извлечения вещества, %	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, ±, %
Ботва свеклы	0,1	0,1—1,0	84,3	1,67	4,72
Корнеплоды свеклы	0,05	0,05—0,5	89,4	1,47	4,15

2. Метод измерений

Метод основан на определении фенпироксимата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием УФ-детектора после его экстракции из образцов ботвы и корнеплодов свеклы ацетонитрилом.

Идентификация фенпироксимата 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 аналитические с пределом взвешивания до 210 г и пределом допускаемой погрешности 0,1 мг	ГОСТ 53228—08
Весы технические с пределом взвешивания до 150 г и пределом допускаемой погрешности 0,1 г	ГОСТ 53228—08
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

Ацетонитрил для ВЭЖХ	ТУ 2634-002-04715285—12
Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная, деионизованная)	ГОСТ Р 52501—05
Фенпироксимат с содержанием основного вещества 99,4 %	
Кислота ортофосфорная, хч	ГОСТ 6552—80
Магний сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4523—67
Натрий хлористый, чда	ГОСТ 4233—77
Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрила и 0,005М ортофосфорной кислоты в соотношении 90 : 10	

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 бифункциональными полярными группами С18, (250 × 4,6) мм, 5 мкм	
Вакуумный манипулятор для работы с патронами для твердофазной экстракции	
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 25, 100 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Пробирки полипропиленовые центрифужные с крышками объемом 50 $см^3$	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, с пределом вакуума до 10 мбар	
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—90.

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист-химик, имеющий опыт работы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, 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 (1,0 $см^3$/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. Раствор хранят при комнатной температуре не более 1 месяца.

7.2.2. Для приготовления подвижной фазы смешивают ацетонитрил с 0,005 М раствором ортофосфорной кислоты в соотношении 90 : 10 по объему, используя мерные цилиндры. Раствор хранят при комнатной температуре не более 1 месяца.

7.3. Приготовление основного и градуировочных растворов

7.3.1. Основной раствор с концентрацией 0,1 мг/см^3: точную навеску фенпироксимата (10 ± 0,1) мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом.

Градуировочные растворы с концентрациями фенпироксимата 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 мкг/см^3 готовят методом последовательного разбавления по объему, используя раствор подвижной фазы (смесь ацетонитрила и 0,005 М ортофосфорной кислоты в соотношении 90 : 10).

7.3.2. Раствор № 1 с концентрацией 2,0 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 2,0 см^3 основного раствора и доводят до метки подвижной фазой.

7.3.3. Раствор № 2 с концентрацией 1,0 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 5 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.3.4. Раствор № 3 с концентрацией 0,5 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 2,5 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.3.5. Раствор № 4 с концентрацией 0,2 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 1 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки подвижной фазой.

7.3.6. Раствор № 5 с концентрацией 0,1 мкг/см^3: в мерную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 1 и доводят объем до метки подвижной фазой.

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 фенпироксимата используют ацетонитрильные растворы вещества, приготовленные из основного раствора методом последовательного разбавления по объему ацетонитрилом.

7.4. Построение градуировочного графика

Для установления градуировочной характеристики (площадь пика – концентрация фенпироксимата в растворе) в хроматограф вводят по 20 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 фенпироксимата в градуировочном растворе.

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

$$C = K\,S,$$ 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:

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

C – аттестованное значение массовой концентрации фенпироксимата в градуировочном растворе,

$C_к$ – результат контрольного измерения массовой концентрации фенпироксимата 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, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79), а также в соответствии с ГОСТ 1722—85 «Свекла столовая свежая, заготовляемая и поставляемая». Для длительного хранения аналитические пробы свеклы (ботва и корнеплоды) помещают в морозильную камеру с температурой –18 °С и хранят в закрытой полиэтиленовой таре.

9. Проведение определения

9.1. Экстракция фенпироксимата из ботвы и корнеплодов свеклы

Навеску измельченных ботвы (5 г) или корнеплодов (10 г) помещают в полипропиленовую центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3, добавляют 20 см^3 ацетонитрила, 4 г безводного сульфата магния и 1 г хлорида натрия, пробирку плотно закрывают и помещают в перемешивающее устройство на 10 мин, затем центрифугируют (скорость вращения центрифуги – 4 000 об./мин). Берут аликвоту 5 мл и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани

не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см^3 подвижной фазы и 20 мм^3 вводят в хроматограф.

9.2. Условия хроматографирования

Высокоэффективный жидкостный хроматограф с УФ-детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки. Аналитическая колонка, заполненная сорбентом с привитыми бифункциональными полярными группами С18, (250 × 4,6) мм, 5 мкм. Температура колонки (30 ± 1) °С. Подвижная фаза: ацетонитрил и 0,005 М ортофосфорная кислота в соотношении 90 : 10. Скорость потока элюента: 1,0 см^3/мин. Рабочая длина волны УФ-детектора 260 нм. Объем вводимой пробы 20 мм^3. Время удерживания фенпироксимата (6,3 ± 0,1) мин

10. Обработка результатов анализа

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

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

S_x – площадь пика фенпироксимата на хроматограмме испытуемого образца, мм^2 (AU);

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

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

P – навеска анализируемого образца, 1,25 г для ботвы и 2,5 г для корнеплодов.

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор фенпироксимата с концентрацией 5,0 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:

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

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

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

При невыполнении условия (1) 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;

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

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

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 0,05 мг/кг*, где * 0,05 мг/кг – предел обнаружения фенпироксимата в корнеплодах свеклы).

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:

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

$\pm\Delta_{л,\bar{X}}$ ($\pm\Delta_{л,\bar{X}'}$) – характеристика погрешности (абсолютная погрешность) результатов анализа, соответствующая содержанию компо-

нента 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), %.

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = X' - X - C_д, \text{ где}$$

X', 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:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (3)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (3) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (3) 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 предела воспроизводимости (R):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le R, \text{ где} \qquad (4)$$

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

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

gost.e-ecolog.ru