

**ДЕРЖАНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ
ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ОДНОЧАСНЕ ВИЯВЛЕННЯ ПЕСТИЦИДІВ ТА
НЕДІОКСИНОПОДІБНИХ ПОЛІХЛОРОВАНИХ БІФЕНІЛІВ В
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ І КОРМАХ, ЗОКРЕМА ПРОДУКТАХ
БДЖІЛЬНИЦТВА, МЕТОДОМ КАПІЛЯРНОЇ ГАЗОВОЇ
ХРОМАТОГРАФІЇ**



КИЇВ – 2023

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 2 від 28 квітня 2023 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 6 від 23 вересня 2024 р.).

Розробники: Чечет О.М., Шуляк С.В., Піщанський О. В., Омельчун Ю.А., Кобиш А.І., Клочкова Н.П.

Рецензенти:

Малімон З. В. – кандидат ветеринарних наук, завідувач науково – дослідного радіологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи;

Шевченко Л. В. – доктор ветеринарних наук, професор кафедри ветеринарної гігієни ім. проф. А. К. Скороходька Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Одночасне виявлення пестицидів та недіоксиноподібних поліхлорованих біфенілів в харчових продуктах і кормах, зокрема продуктах бджільництва, методом капілярної газової хроматографії : метод. рекомендації; Чечет О.М., Шуляк С.В., Піщанський О. В., Омельчун Ю.А., Кобиш А.І., Клочкова Н.П.; ДНДІЛДВСЕ, м. Київ, 2023; 26 с.

В даних методичних рекомендаціях описані лабораторні підходи з визначення залишків аналітів, зокрема пестицидів і недіоксиноподібних поліхлорованих біфенілів (ПХБ) після їх екстрагування з матриці розчинниками різної полярності, очистки екстрактів за допомогою сорбентів та послідууючої кількісної ідентифікації методом капілярної газової хроматографії. Рівень межі кількісного визначення методу забезпечує вимоги Регламенту (ЕС) № 396/2005 Європейського Парламенту і Ради від 23 лютого 2005 року щодо максимальних рівнів залишків пестицидів в сировині тваринного і рослинного походження, в тому числі продуктах бджільництва, де встановлений допустимий рівень межі за замовчуванням – 0,01 мг/кг. Методичні рекомендації призначені для фахівців регіональних і міжрайонних державних лабораторій Держпродспоживслужби, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації зі спеціальностей 211 — «Ветеринарна медицина» та 212 — «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза».

ДНДІЛДВСЕ, 2023 (Шуляк С.В.)

ЗМІСТ

СПИСОК ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	
ВВЕДЕННЯ	5
1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ	5
2. ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ	6
3. ПРИНЦИП МЕТОДУ	7
4. ВИМОГИ ДО КВАЛІФІКАЦІЇ СПЕЦІАЛІСТІВ	7
5. УМОВИ ВИКОНАННЯ ВИМІРЮВАНЬ	7
6. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОЦІНКИ ПРИДАТНОСТІ МЕТОДУ	7
7. РЕАКТИВИ ТА ДОПОМІЖНІ МАТЕРІАЛИ	8
8. ЗАСОБИ ВИМІРЮВАЛЬНОЇ ТЕХНІКИ, ДОПОМІЖНЕ ОБЛАДНАННЯ	9
9. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ВИПРОБУВАНЬ	10
10. ВИКОНАННЯ ВИПРОБУВАНЬ	11
11. РОЗРАХУНОК І ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	21
12. ОЦІНКА ПРИДАТНОСТІ МЕТОДУ	22
13. ВИМОГИ БЕЗПЕКИ	23
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	24

СПИСОК ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

Б/в – безводний;

ВРМ – внутрішній референтний матеріал;

ГХ – метод газової хроматографії;

ДЕЗ – детектор електронного захвату;

мг/кг – міліграм на кілограм;

ПХБ – поліхлоровані біфеніли;

СП – синтетичні піретроїди;

ФОС – фосфорорганічні сполуки;

х.ч. – хімічно чистий;

ХОС – хлорорганічні сполуки;

GUM – керівництво по вираженню невизначеності в вимірюваннях (Guide to the expression of Uncertainty in Measurement);

IARC – агентство з дослідження раку у складі Всесвітньої організації охорони здоров'я ООН.

ВВЕДЕННЯ

Методичні рекомендації розроблені, як універсальний метод визначення залишків пестицидів та ПХБ в сировині тваринного і рослинного походження, зокрема в продуктах бджільництва, межа кількісного визначення якого забезпечувала б вимоги Регламенту (ЕС) № 396/2005 Європейського Парламенту і Ради від 23 лютого 2005 року щодо максимальних залишків пестицидів в/на харчових продуктах та кормах рослинного і тваринного походження, який вносить зміни до Директиви Ради № 91/414/ЕЕС та Наказу МОЗ України № 368 від 13.05.2013 року. А також розробка методики, яка дозволяє одночасно визначати всі перераховані показники при одних і тих же самих параметрах приладу.

Методичні рекомендації включають такі етапи: підготовку зразків до дослідження, екстрагування аналітів з матриці методом рідинної екстракції, очистки екстрактів з застосуванням колонкової хроматографії та подальше виявлення аналітів з застосуванням капілярної газової хроматографії та детектора електронного захвату.

Міжнародне агентство з дослідження раку (IARC) класифікує деякі пестициди як канцерогенні для людини, оскільки вони можуть викликати генотоксичність, ендокринні та хромосомні зміни, а також мутації та аномалії в ембріональних або соматичних клітинах.

Необхідність дослідження даних сполук обумовлена також Стокгольмською конвенцією про стійкі органічні забруднювачі ратифікованою Законом N 949-V (949-16) від 18.04.2007, ВВР, 2007, N 30, ст.396, зареєстрованим в Мініюсті України 20.02.17 р. за № 235/30103.

1. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Пестициди — хімічні сполуки, які використовуються для знищення комах, гризунів, грибків, бур'янів та інших шкідливих організмів. І відповідно до напрямку застосування поділяються на інсектициди, гербіциди, нематоциди, фунгіциди, молюскоциди, альгіциди, родентициди, регулятори росту рослин, дефоліанти, десиканти та інші сполуки.

За останні роки використання засобів захисту рослин значно розширилося в сільському господарстві, що призводить до забруднення продукції, в тому числі і продуктів бджільництва. Пестициди як правило, використовується не лише для запобігання хвороб рослин, але й для збереження харчових продуктів, тобто відіграють важливу роль у виробництві, переробці харчової продукції та її зберіганні. Основними перевагами пестицидів є очікуваний негайний ефект після застосування і підвищення врожайності та якості продукції.

Пестициди є різних хімічних груп, але фосфорорганічні сполуки, хлорорганічні сполуки, синтетичні піретроїди та карбамати є найпоширенішими пестицидами, які викликають проблеми як у людей так і в навколишньому середовищі.

ПХБ – клас хлорованих органічних хімічних речовин. Вони дуже стабільні суміші, стійкі до екстремальних температур і тиску. Являють собою або маслянисті рідини, або тверді речовини, від безбарвного до світло-жовтого кольору. У навколишньому середовищі немає відомих природних джерел ПХБ. Деякі ПХБ є леткими і можуть існувати у вигляді пари в повітрі. Вони не мають запаху чи смаку, а у навколишнє середовище надходять у вигляді сумішей, що містять різні окремі хлоровані біфенільні компоненти, відомі як конгенери, а також домішки.

2. ГАЛУЗЬ ЗАСТОСУВАННЯ

Методичні рекомендації призначені для фахівців регіональних державних лабораторій Держпродспоживслужби, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації зі спеціальностей 211 – «Ветеринарна медицина» та 212 –

«Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза», як рекомендації для визначення залишків пестицидів та недіоксиноподібних ПХБ у продуктах харчування та кормах методом капілярної газової хроматографії.

Межа кількісного визначення методу для хлорорганічних сполук та недіоксиноподібних поліхлорованих біфенілів – 0,001 мг/кг, фосфорорганічних сполук і синтетичних піретроїдів – 0,01 мг/кг.

3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначення залишків пестицидів та недіоксиноподібних ПХБ в сировині тваринного і рослинного походження, зокрема в продуктах бджільництва проводиться методом газової хроматографії з використанням детектора електронного захвату (ГХ/ДЕЗ), після відповідної екстракції їх з проби розчинником та очистки екстракту. Ідентифікація здійснюється за часом утримання, а кількісне визначення — методом зовнішніх стандартів за площею піків.

4. ВИМОГИ ДО КВАЛІФІКАЦІЇ СПЕЦІАЛІСТІВ

Для виконання хроматографічних вимірювань і обробки їх результатів допускаються фахівці, що мають вищу хімічну, або ветеринарну освіту, пройшли навчання з хроматографічних методів вимірювань, ознайомлені з інструкцією по експлуатації хроматографа та мають допуск для виконання даної роботи.

5. УМОВИ ВИКОНАННЯ ВИМІРЮВАНЬ

При виконанні вимірювань згідно з інструкцією до обладнання необхідно дотримуватися таких умов:

- температура навколишнього середовища ($+18^{\circ}\text{C} - +28^{\circ}\text{C} \pm 2$);
- атмосферний тиск від 84 до 107 кПа (від 630 до 800 мм рт. ст.);
- відносна вологість повітря (при $+20^{\circ}\text{C}$) 5 – 95 %;
- напруга в електричній мережі живлення (220 ± 10) В.

6. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОЦІНЮВАННЯ ПРИДАТНОСТІ МЕТОДУ

Для валідації методики застосовувались критерії оцінювання згідно з SANTE/11312/2021 Керівництва для аналітичного контролю якості оцінювання

придатності методів аналізу пестицидів в продовольстві (сировині) (Табл. 1) [3].

Таблиця 1

Критерії оцінки придатності методу

Діапазон вимірювань масової частки, мг/кг	Процент повернення (на трьох рівнях збагачення), %	Повторюваність (r), %	Внутрішньо-лабораторна відтворюваність (R), %	Специфічність
0,001-0,1	70-120	20,0	20,0	< 30% від межі кількісного визначення

7. РЕАКТИВИ ТА ДОПОМІЖНІ МАТЕРІАЛИ

Всі реактиви та розчини мають бути придатними для аналізу залишків пестицидів та недіоксиноподібних поліхлорованих біфенілів.

7.1 Ацетонітрил для хроматографії, SupraSolv;

7.2 Ацетон для хроматографії, SupraSolv;

7.3 n-Гексан для хроматографії, SupraSolv;

7.4 Ацетонітрил (8.1), насичений n-гексаном (8.3);

7.5 Диетиловий ефір, вільний від перекису, дистильований і з 2,0 об'ємними процентами етанолу (абсолютно) стабілізований. "медичний";

7.6 Вода деіонізована, яка не містить хлоридів.

7.7 Суміш: n – гексан (8.3) / ацетон (8.2) в співвідношенні 2:1.

7.8 Натрій сірчаноокислий, безводний, х.ч.

7.9 2%- ний розчин сульфату натрію.

В конічну колбу місткістю 1 дм³ поміщають 20 ±0,01 г сульфату натрію і доводять до мітки дистильованою водою. Зберігається в скляній колбі зі шліфом при кімнатній температурі 6 міс.

7.10 Натрій хлористий, х.ч., Sigma-Aldrich.

7.11 Розчин хлориду натрію насичений.

В конічну колбу, в якій міститься 1 дм³ деіонізованої води додають

кристали хлористого натрію до тих пір, поки вони при кімнатній температурі не перестануть розчинятися. Зберігається в скляній колбі з пробкою при кімнатній температурі 6 міс.

7.12 Суміш елюентів А: гексан (8.3) і диетиловий ефір (8.5), об'ємне співвідношення (V/V) 94:6.

7.13 Суміш елюентів В: гексан (8.3) і диетиловий ефір (8.5), об'ємне співвідношення (V/V) 85:15.

7.14 Суміш елюентів С: гексан (8.3) і диетиловий ефір (8.5), 50:50 (V/V), або ацетон (кумафос).

7.15 Етиловий спирт, 96%.

7.16 Додекан, 99,8%, фірми "Fluka".

7.17 Оксалат натрію, х.ч., Sigma-Aldrich.

7.18 Флорисіл для хроматографії з розміром частинок 150 - 250 мкм.

Перед використанням флорисіл нагрівають протягом 5 годин при 130°C в сушильній шафі. Сорбент залишається активним - 5 діб, зберігають його в ексикаторі.

7.19 Вата знежирена (знежирення проводиться за допомогою розчинників).

7.20 Морський пісок для хроматографії, 50 +70 mesh, Sigma-Aldrich.

7.21 Паперові складчасті фільтри, діаметр 150 мм, швидкість фільтрації 27 с., товщина 0,2 мм, загального призначення.

7.22 Стандартні зразки складу пестицидів та недіоксиноподібних ПХБ від фірми «Sigma-Aldrich» з чистотою 99,9%.

7.23 Проміжний стандартний розчин сумішей пестицидів та ПХБ з концентрацією 0,1 мкг\мл готують в гексані і зберігають в холодильнику при +4°C 1 міс. Схема приготування градуювальних робочих розчинів вказана в Табл. 5.

8. ЗАСОБИ ВИМІРЮВАЛЬНОЇ ТЕХНІКИ, ДОПОМІЖНЕ ОБЛАДНАННЯ

8.1 Подрібнювач для проб «Retsch»;

8.2 Струшувач для колб універсальний Іка «KS 501 D».

- 8.3 Вакуумний ротаційний випаровувач Heidolph «Laborota 4002»;
- 8.4 Система отримання зверхчистої води «Sartorius Arium® Pro»;
- 8.5 Випарювач вакуумний центрифужний ”SP Scientific Genevac Rocket Synergy 2 ”;
- 8.6 Струшувач для пробірок «Biosan Vortex V-1»;
- 8.7 Центрифуга низькотемпературна «Jouan GR 4.22»;
- 8.8 Ваги лабораторні OHAUS «AR 2140» 2-го класу точності, з межею зважування до 210 г.
- 8.9 Ваги лабораторні «OHAUS» 3-го класу точності з межею зважування до 1500 г.
- 8.10 Скло хроматографічна колонка (26 x 220 мм);
- 8.11 Патрони для твердофазної екстракції (ТФЕ) на 20 мл, пусті;
- 8.12 Прилад для твердофазної екстракції «Visiprep™ SPE Vacuum Manifold»;
- 8.13 Газовий хроматограф з детектором електронного захвату (ДЕЗ) та системою автоматичного введення проб (Таб. 2);
- 8.14 Кварцева капілярна колонка SPB-5, Supelco, 30 м × 0.25 мм, × 0.25 мкм.
- 8.15 Лабораторний скляний посуд (колби плоскодонні, колби для випаровування, фільтрувальні лійки, ділильні лійки) та мірний посуд (колби, циліндри) класу точності А, SIMAX.
- 8.16 Дозатори піпеткові одноканальні об'ємом 0,01 - 5 см³, Eppendorf.

Примітка. Допускається застосування іншого вимірювального та допоміжного обладнання, яке не уступає вищевказаним за метрологічними і технічними характеристиками і забезпечують необхідну точність вимірювання, а також реактивів за якістю не гірше вищевказаних.

9. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ВИМІРЮВАНЬ

9.1 Відбір зразків для дослідження

Проби відбираються відповідно до вимог Наказу Міністерства аграрної політики № 289 від 25.06.2018, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України за № 857/32309 від 23.07.18 р., Директиви Комісії 2002/63/ЕС від 11 липня 2002

року про встановлення методів відбору для офіційного контролю залишків пестицидів у/на продуктах рослинного та тваринного походження [7,8].

Умови відбирання, транспортування, зберігання та підготовки проб мають виключати можливість змін якісного та кількісного складу продукту, що аналізується.

9.2 Підготовка зразків до дослідження

Зразок подрібнюють та гомогенізують (9.1). Якщо є можливість, то з застосуванням кріоподрібнення.

Від 500 г гомогенізованого зразка відважують необхідну кількість переважно в цілих грамах з точністю до $\pm 0,01$ г.

10. ВИКОНАННЯ ВИПРОБУВАНЬ

10.1 Екстрагування

10.1.1 Молокопродукти.

25 г проби гомогенізують з 50 см³ етанолу (8.15) і 1 г оксалату натрію (8.18), або оксалату калію протягом 2 - 3 хв. (якщо потрібно додають 12 см³ деіонізованої води (8,6)). Гомогенат переводять в стакан центрифуги місткістю 250 см³, змішують з 50 см³ диетилового ефіру (8.5) і інтенсивно струшують протягом 1 хв. Потім додають 50 см³ n-гексану (8.3) і також струшують протягом 1 хв.

Далі гомогенат центрифугують (9.7) 5 хв. при швидкості 1500 об/хв., органічну фазу переводять в літрову ділильну лійку, яка містить 500 - 600 см³ деіонізованої води і 30 см³ насиченого розчину хлориду натрію (8.11). Двічі екстрагують сумішшю диетилового ефіру і гексану 1:1 по 25 см³ при сильному струшуванні. Після кожного екстрагування суміш центрифугують. Органічні фази об'єднують в ділильній лійці, обережно струшують і водну фазу видаляють. Органічну фазу двічі промивають 100 см³ деіонізованої води (8.6), причому щоразу водна фаза викидається.

Потім органічну фазу фільтрують через скляну фільтрувальну лійку з складчастим паперовим фільтром (8.21) та безводним сульфатом натрію (8.8), а

елюат збирають в круглодонну колбу для випаровування місткістю 500 см³. Лійку кілька разів промивають невеликою кількістю гексану.

Отриманий елюат випаровують на ротаційному випарювачі (9.3) при температурі близько 40°C під низьким тиском (тиск $\sim 1 \cdot 10^{-1}$) досуха.

10.1.2 Молоко.

10.1.2.1 Молоко цільне.

У хімічній склянці на 500 см³ гомогенізують 50 см³ молока з 250 см³ суміші, що складається з n-гексану й ацетону в співвідношенні 2:1 (8.7) до однорідності протягом 4 хв. Після чого фази розділяють, верхню органічну фазу декантують в ділильну лійку на 1000 см³, в якій міститься 250 см³ 2% розчину сульфату натрію (8.9), а у хімічну склянку знову додають 50 см³ суміші n-гексану й ацетону у співвідношенні 2:1 (8.7), перемішують і також декантують в ту ж ділильну лійку, далі струшують протягом 30 с. При появі емульсії додають насичений розчин хлориду натрію (8.11). Після цього фази розділяють, нижню (водну) викидають.

Органічна фаза (верхня) струшують з додатковими 250 см³ 2 % розчину сульфату натрію (8.9). Краплі води на бічних стінках можуть змиватися при обертанні ділильної лійки навколо поздовжньої осі. Якщо водна фаза цілком зібрана в нижній частині, то вона зливається аж до 2 см³ і викидається, а органічна (верхня) фаза фільтрується в круглодонну колбу через скляну фільтрувальну лійку, заповнену шаром безводного сульфату натрію в кількості 40 г. Розчин випаровують в вакуумному ротаційному випарювачі (10.2) при температурі близько 40°C під низьким тиском до об'єму приблизно 3-5 см³.

10.1.2.2 Молоко, що пройшло теплову обробку.

30 см³ молока переносять в центрифужну пробірку на 250 см³, гомогенізують 2 хв. з 50 см³ ацетону (8.2) і центрифугують 5 хв. при 1500 об/хв (t - 8°C). Верхню фазу декантують в ділильну лійку, а нижню знову гомогенізують з 35 см³ ацетону (8.2).

Після повторного центрифугування верхню фазу також переводять в ділильну лійку, в яку додають 70 см³ n-гексану (8.3). Лійку струшують 10 хв., і

10 хв. витримують для кращого розділення шарів. Операцію повторюють з додатковими 50 см³ n-гексану (8.3). Об'єднані екстракти випаровують на ротаційному випаровувачі до 3-5 см³, які переносять в підготовлений патрон для твердофазної екстракції (9.11).

10.1.3 Сир твердий та м'який.

10 г сиру змішують з подвійною кількістю сульфату натрію безводного (8.8), додають 50 см³ n-гексану (8.3) і струшують на апараті для струшування зразків 40 хв. Отриманий розчин декантують в колбу випарювача через фільтр, а екстракцію повторюють з додатковими 50 см³ гексану. Об'єднані екстракти випаровують на ротаційному випарювачі.

Якщо це твердий сир, то сульфат натрію безводний не використовується і від об'єданого екстракту (100 см³) відбирають для подальшого дослідження 10 см³.

10.1.4 Сухе молоко.

2 г сухого молока переносять в центрифужну пробірку на 50 см³ і змішують з 3 см³ деіонізованої води (8.6) (витримують деякий час), гомогенізують 2 хв. з 8 см³ ацетону (8.2) і центрифугують 5 хв. при 1500 об/хв (t - 8°C). Верхню фазу декантують в ділильну лійку, а нижню знову гомогенізують з 6 см³ ацетону (8.2).

Після повторного центрифугування верхню фазу також переводять в ділильну лійку, в яку додають 10 см³ гексану (8.3). Лійку струшують 10 хв., і 10 хв. витримують для кращого розділення шарів. Операцію повторюють з додатковими 5 см³ гексану (8.3). Об'єднані шари гексану випаровують на ротаційному випаровувачі до 2 см³, які далі наносять в підготовлений патрон для твердофазної екстракції (9.11).

10.1.5 Тваринні і рослинні жири та олії.

200 г зразка нагрівають (якщо це тверді жири) в хімічному стакані на водяній бані до температури 50 - 60°C, поки жир не відокремиться. Жир декантують через складчастий паперовий фільтр, або через шар знежиреної вати (8.19).

Відбирають 1 г проби для подальшої очистки.

10.1.6 М'ясо та м'ясопродукти.

30 г подрібненої проби змішують в фарфоровій ступці з такою кількістю сульфату натрію безводного (8.8), щоб утворилась крихтеподібна суміш, яку переносять в конічну колбу на 250 см³. Додають 150 см³ суміші з n-гексану й ацетону 2:1 (8.7) і струшують на струшувачі для колб (10.4) 40 хв. Отриманий екстракт декантують через лійку з фільтрувальним папером, заповнену на 2/3 сульфатом натрію безводним, в колбу для випаровування, а залишок струшують з додатковими 75 см³ суміші n-гексану й ацетону (8.7) 30 хв. і також декантують.

Об'єднаний екстракт випаровують на ротаційному випаровувачі при температурі 40°C під низьким тиском.

10.1.7 Риба та рибопродукти.

30 г подрібненої проби змішують в фарфоровій ступці з такою кількістю сульфату натрію безводного (8.8), щоб утворилась кришкоподібна суміш, яку переносять в конічну колбу на 250 см³. Додають 150 см³ суміші з n-гексану й ацетону 2:1 (8.7) і струшують на струшувачі (9.2) 40 хв. Отриманий екстракт декантують через фільтрувальну лійку з паперовим фільтром, заповнену на 2/3 сульфатом натрію безводним, в колбу для випаровування, а залишок струшують з додатковими 75 см³ суміші n-гексану й ацетону (8.7) 30 хв. і також декантують.

Об'єднаний екстракт випаровують на ротаційному випарювачі при температурі 40°C під низьким тиском.

10.1.8 Яйця.

Збити жовток і білок до рівномірного стану.

Наважку 10 г розтирають з безводним сульфатом натрію (8.8) та піском (8.20) (50:50) в фарфоровій ступці.

Отриману суміш через фільтрувальну лійку вносять до ділильної лійки, в яку попередньо вкладена знежирена вата та насипаний на висоту приблизно 2 см³ безводний сульфат натрію.

Екстрагують пробу, пропускаючи через ділильну лійку 150 см³ суміші гексан-ацетон (2:1), не струшуючи її.

Отриманий екстракт випаровують на ротаційному випарювачі при температурі 40°C під низьким тиском.

Сухий залишок розчиняють в 3-5 см³ гексану і переносять в попередньо підготовлену хроматографічну колонку (9.10). Колбу споліскують гексаном.

10.1.9 Мед бджолиний.

30,0 г меду змішують в фарфоровій ступці з такою кількістю сульфату натрію безводного (10.8), щоб утворилась крихтеподібна суміш, яку переносять в колбу на 500 см³. Додають 100 см³ ацетону (8.2) і струшують на струшувачі для колб 40 хв.

Екстракт декантують через скляну фільтрувальну лійку з паперовим складчастим фільтром в колбу для випаровування на 250 см³. Зразок екстрагують з додатковими 50 см³ ацетону протягом 30 хв., який також декантують через паперовий фільтр в колбу для випаровування. Об'єднані екстракти випаровують на ротаційному випарювачі при температурі 40°C під низьким тиском до об'єму 3-5 см³ і переносять до попередньо підготовленого картриджу (9.11). Колбу споліскують розчинником, який також переносять до картриджу.

10.1.10 Вода питна.

200 мл переносять в ділильну лійку на 500 см³ і екстрагують тричі гексаном по 30 см³. Об'єднаний екстракт пропускають через скляну фільтрувальну лійку з паперовим складчастим фільтром, заповненим натрієм сірчаноокислим безводним і випаровують на ротаційному випаровувачі при температурі 40 °C.

10.1.11. Комбікорма, комбікормова сировина, інші сухі матеріали.

Наважку 20 г поміщують в конічну колбу на 250 см³, додають 50 см³ ацетону (8.2) і струшують на струшувачі 30 хв.

Екстракт фільтрують через фільтрувальну лійку з безводним сульфатом натрію (10.8) в мірний циліндр на 100 см³. Повторюють екстракцію. Екстракти об'єднують. Фільтр промивають ацетоном (8.2) по 5-10 см³, доводячи загальний об'єм екстракту до 100 см³. Змішують. Відбирають для дослідження 10 см³ і випаровують на ротаційному випаровувачі, або потоком повітря досуха.

10.1.12. Рослинна продукція.

Наважку 25 г поміщують в конічну колбу на 250 см³, додають 25 см³ ацетону (8.2) і 25 см³ деіонізованої води (8.6) та струшують на струшувачі для колб 40 хв. Екстрагування повторюють двічі. Екстракт фільтрують і витримують при +4°C 1 год. За необхідності, фільтрування повторюють. Об'єднаний фільтрат переносять в ділильну лійку і проводять переекстрагування з 30 см³ гексану протягом 10 хв. Переекстракцію повторюють двічі. Об'єднаний екстракт випаровують до об'єму 1 см³.

10.2 Очистка.

10.2.1 Розділення фаз: гексан/ацетонітрил.

Якщо в пробі великий вміст жиру, проводять попередньо ацетонітрильну очистку екстракту.

Отриманий залишок після екстракції розчиняють в гексані (8.3), щоб загальний об'єм жиру та гексану складав 15 см³ і переносять його в ділильну лійку місткістю 125 см³, додають 30 см³ ацетонітрилу (8.1), насиченого гексаном і суміш 1 хв. сильно струшують.

Після поділу фаз нижню (ацетонітрилову) зливають в ділильну лійку об'ємом 1000 см³, а до фази, що залишилась, знову додають 30 см³ ацетонітрилу насиченого гексаном (8.4) і сильно струшують три рази по 1 хв.

Далі після поділу фаз нижню фазу ацетонітрилову також переносять в ділильну лійку об'ємом 1000 см³.

До об'єднаного ацетонітрилового екстракту додають 650 см³ деіонізованої води (8.6), 40 см³ насиченого розчину хлориду натрію (8.10) і 100 см³ гексану (8.3), обережно струшують в горизонтальному напрямку протягом 30-45 с.

Після поділу фаз водну (нижню) зливають в другу ділильну лійку місткістю 1000 см³ та додають до неї знову 100 см³ гексану, 15 с сильно струшують, а після поділу фаз нижню водну відкидають, а фазу гексану об'єднують з фазою гексану в першій ділильній лійці місткістю 1000 см³.

Об'єднані фази двічі промивають дистильованою водою по 100 см³.

Водну фазу викидають, а гексанові фазу пропускають через фільтрувальну лійку з безводним сульфатом натрію в ємність для випарювання.

Фільтрувальну лійку промивають гексаном, екстракт концентрують на ротаційному вакуумному випаровувачі до 3-5 см³ та переносять його в активовану Florisil–колонку.

10.2.2 Очистка на колонці з флорисілом.

10.2.2.1. Підготовка хроматографічної колонки.

У скляну хроматографічну колонку насипають шар активованого флорисілу (8.18) висотою 10 см, шар безводного сульфату натрію (8.8), висотою 1 см і активують її 15-20 см³ гексану (8.3).

В підготовлену хроматографічну колонку вносять екстракт проби.

Елююють колонку зі швидкістю не більше 5 мл/хв почергово сумішами елюентів А (8.12) і якщо потрібно В (8.13) та С (8.14) об'ємом 120 см³.

Елюат концентрують до об'єму 3 см³ (зразки сухих матеріалів концентрують до об'єму 2 см³, зразки з високим вмістом жиру - до 1 см³).

10.2.2.2 Підготовка картриджу для твердофазної екстракції (ТФЕ).

Другий варіант: в пустий картридж для ТФЕ (9.11) насипають шар активованого флорисілу висотою 4-5 см і шар безводного сульфату натрію висотою 1 см та активують гексаном (8.3).

Вносять в активований картридж, який знаходиться в твердофазному екстракторі (9.12), отриманий екстракт.

Елюють картридж почергово зі швидкістю не більше 5 мл/хв сумішами елюентів А, або якщо потрібно В і С об'ємом по 50 см³ кожного.

Елюат випаровують до об'єму 3 см³ (зразки сухих матеріалів концентрують до об'єму 2 см³, зразки з високим вмістом жиру - до 1 см³).

Примітки:

– Якщо немає можливості виконати всі етапи пробопідготовки в один день, підготовлений екстракт дозволяється зберігати в холодильнику (+4 °С) в щільно закритому посуді зі шліфом не більше 5 діб;

– Для попередження летючості пестицидів, перед випаровуванням до екстракту додають 50 мкл додекану (8.16);

– Перелік показників може бути розширений за рахунок аналітів, які належать до тих же самих хімічних груп та схожі за фізико-хімічними властивостями.

10.3 Внутрішньолабораторний контроль результатів випробувань

Кожного разу при проведенні дослідження готується проба з добавкою, для приготування якої наважують дві наважки досліджуваного матеріалу та в одну з них вносять добавку (наприклад, з розрахунку на 30 г наважки додають по 3 см³ сумішей ХОС і ПХБ з концентрацією 0,01 мкг/см³ та ФОС і СП з концентрацією 0,1 мкг/см³). Вноситься та суміш пестицидів, на наявність яких проводиться дослідження.

Паралельно постійно контролюють чистоту реактивів, або виконують експеримент з холостою пробюю (blank). Для холостої проби використовують чисту матрицю (ВРМ), яку проводять через всі етапи дослідження: екстрагування, очистка та хроматографування.

10.4 Хроматографування

Вводять 1 мм³ отриманого екстракту в хроматограф (об'єм введеного екстракту має бути однаковим з об'ємом введених градуювальних розчинів). Почергово вводять в хроматограф холосту пробу, пробу з добавкою та досліджувані проби.

Таблиця 2

Конфігурація приладу та режим роботи

Конфігурація	Режим роботи
Газовий хроматограф	Varian CP 3800
Капілярна колонка:	SPB-5, Supelco, 30m x 0,25 mm x 0,25µm
Стационарна фаза:	5% феніл, 95% диметилполісилоксан
Температура інжектора:	250°C
Температура детектора:	300°C
Температура колонки:	Програмована (див. Таблицю 3)
Режим введення проби:	Split 1:10
Об'єм інжектування:	1 мкл
Газ-носії:	Азот, чистотою 99,999% (1,0 мл/хв)

Час виходу аналітів залежить від хроматографічної системи та заданих параметрів методу: типу колонки, її розмірів, типу стаціонарної фази, заданого температурного режиму в термостаті колонок, швидкості потоку газу – носія через хроматографічну колонку, та інш.

Програмований температурний режим термостату колонок

Швидкість нагріву, °С/хв	Температура, °С	Час, хв	Загальний час, хв
Початкова	80	5	5,0
15	200	0	13,0
4	218	0	17,5
0,5	220	0	21,5
2,3	250	0	35,0
20,0	280	13,50	50,0

Таблиця 4. Час утримування аналітів.

№ п/п	Назва аналіту	Час утримування, хв
1.	альфа – ГХЦГ	16,01
2.	Гексахлорбензол	16,22
3.	бета – ГХЦГ	16,60
4.	гамма – ГХЦГ	16,77
5.	Гептахлор	18,74
6.	Альдрін	19,94
7.	Гептахлору екзо – поксид	21,48
8.	Гептахлору ендо – епоксид	21,67
9.	цис – Хлордан	23,23
10.	транс – Хлордан	22,53
11.	альфа – Ендосульфан	23,14
12.	4,4-ДДЕ	24,18
13.	2,4-ДДЕ	22,59
14.	Дильдрін	24,41
15.	Ендрін	25,53
16.	4,4-ДДД	26,42
17.	2,4-ДДД	24,48
18.	4,4-ДДТ	28,56
19.	2,4-ДДТ	26,38
20.	ПХБ 28	18,18
21.	ПХБ 52	19,20
22.	ПХБ 101	22,77
23.	ПХБ 153	27,19
24.	ПХБ 138	28,75
25.	ПХБ 180	32,90
26.	Паратіон - метил	18,36
27.	Малатіон	19,44
28.	Діазінон	16,93
29.	Диметоат	16,21
30.	Дихлофос	11,24
31.	Фосмет	31,46
32.	Хлорпірифос	19,92
33.	Хлорпірифос-метил	18,33
34.	Протіофос	23,80
35.	Піразофос	36,01

36.	Кумафос	37,49
37.	Паратіон	19,98
38.	Етіон	26,64
39.	Біфентрин	31,90
40.	Перметрин – цис	37,02
41.	Перметрин – транс	37,40
42.	Дельтаметрин	44,37
43.	Циперметрин I	39,63
44.	Циперметрин II	39,81
45.	Циперметрин III	39,87
46.	Циперметрин VI	39,91
47.	Фенвалерат I	41,95
48.	Фенвалерат II	42,03
49.	Есфенвалерат	42,45
50.	лямбда – Цигалотрин	35,48

Умови виконання вимірювань і черговість виходу аналітів підлягають перевірці та, при потребі, корегуванню в таких випадках:

- при використанні іншої моделі газового хроматографа;
- при використанні капілярної хроматографічної колонки з іншими параметрами та іншою фазою;
- після ремонту вузлів хроматографа, що впливають на чутливість детектора, або при заміні детектора.

10.5 Градування.

Для побудови градуювального графіка готують стандартні розчини сумішей аналітів з п'яти концентрацій (Табл.5), які по чергово вводять в хроматограф. Коефіцієнт кореляції має бути не менше 0,99. Будується градуювальний графік один раз в три місяці. Контроль градування проводять одним з робочих розчинів, який вводять в хроматографічну систему кожного разу перед проведенням досліджень. Відхилення має бути не більше 20%, в протилежному випадку необхідно будувати новий градуювальний графік.

Схема приготування градуювальних розчинів

Суміш	Концентрація градуювально-го розчину, мкг\мл	Об'єм проміжного розчину (8.23), мкл	Об'єм розчинника, мкл	Розчинник
ХОС, ПХБ	0,001	10	990	п. 8.3
ХОС, ПХБ	0,005	50	950	п. 8.3
ХОС, ПХБ, ФОС, СП	0,01	100	900	п. 8.3
ФОС, СП	0,02	200	800	п. 8.3
ХОС, ПХБ, ФОС, СП	0,03	300	700	п. 8.3
ХОС, ПХБ, ФОС, СП	0,05	500	500	п. 8.3
ФОС, СП	0,1	-	-	-

11. РОЗРАХУНОК І ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ідентифікація здійснюється за допомогою методу газової хроматографії з використанням детектора захвату електронів (ДЕЗ) та кількісне визначення - методом зовнішніх стандартів за площею піків.

Вважається, що дана сполука не виявлена, якщо на хроматограмі досліджуваного зразку немає піку у відповідний час утримання того чи іншого аналіту. Якщо ж пік є і концентрація аналіту, перевищує його мінімально-допустимий рівень, необхідно повторно провести дослідження. Надійність ідентифікації збільшиться, якщо використати капілярну колонку з більш полярною фазою.

Результати слід представити в міліграмах на кг з точністю до чотирьох цифр після коми:

$$\omega = \frac{C \cdot V \cdot V_2}{V_1 \cdot m} \cdot 1000, \quad (1)$$

C – концентрація по калібрувальному графіку, мкг/см³;

V – об'єм отриманого екстракту, см³;

V₁ – об'єм градуювального розчину, введеного у хроматограф, мм³;

V₂ – об'єм екстракту проби, введеного у хроматограф, мм³;

m – об'єм зразку, г.

12. ОЦІНЮВАННЯ ПРИДАТНОСТІ МЕТОДУ

Таблиця 6.

Результати оцінювання придатності методу

Діапазон вимірювань масової частки, мг/кг	Процент повернення (на трьох рівнях збагачення), %	Повторюваність (r), %	Внутрішньо-лабораторна відтворюваність (R), %	Розширена невизначеність, U
0,001-0,1	70-120	< 20,0	< 20,0	< 30%

Нормативні значення для контролю критеріїв оцінювання придатності методів визначення залишкових кількостей пестицидів нормуються згідно з SANTE/11312/2021 «Керівництва для аналітичного контролю якості оцінювання придатності методів аналізу пестицидів в продовольстві (сировині)» (Таблиця 1) [1], а саме діапазон проценту повернення для поточних випробувань складає 70-120 %, межа нормативного контролю повторюваності та внутрішньолабораторної відтворюваності – 20%.

12.1 Оцінювання невизначеності випробувань.

Розширена невизначеність вимірювань методики складає 30 %, що не перевищує нормативного значення 50% для методів визначення [1].

Згідно до Посібника по застосуванню Рішення 2002/657/EC SANCO/2004/2726-rev 4 грудня 2008, за сумарну стандартну невизначеність приймається стандартне відхилення внутрішньолабораторної відтворюваності:

$$u_c = S_R, \text{ де (2)}$$

S_R - внутрішньолабораторна відтворюваність.

Однією з різновидностей невизначеності вимірювання відповідно до GUM [4]. є розширена невизначеність, яка визначається за формулою:

$$U = k \cdot u_c(y), \text{ (3)}$$

Тобто добуток сумарної стандартної невизначеності $u_c(y)$ на коефіцієнт охоплення k .

Обчислення розширеної невизначеності передбачає знання закону розподілу результатів вимірювання. Оскільки ця умова зазвичай не виконується (згідно GUM) вибрано значення коефіцієнта охоплення $k = 2$, яке приблизно відповідає довірчій ймовірності $P=95\%$.

У будь-якому разі коефіцієнт k повинен бути вказаний, щоб можна було, при необхідності, відновити стандартну невизначеність u .

Для перерахунку розширеної невизначеності стосовно більшого рівня концентрацій, ніж той на якому вона визначалась, використовується формула:

$$U = \left(\frac{U_1}{X_1} \right) \times X_2, \text{ де: (4)}$$

U - розширена невизначеність для рівня концентрацій X_2 , мкг/дм³;

X_1 - рівень концентрації, на якому визначалась невизначеність, мкг/дм³;

X_2 - отриманий результат при щоденних дослідженнях, мкг/дм³.

13. ВИМОГИ БЕЗПЕКИ

Виконуючи вимірювання, слід дотримуватися правил техніки безпеки, викладених в інструкції з експлуатації до приладів що використовуються під час проведення досліджень, правил безпечної роботи в хімічній лабораторії, викладених у «Правилах охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях», затверджених Міністерством надзвичайних ситуацій України 11.09.2012 №1192 (зареєстровано в Міністерстві юстиції України 25 вересня 2012 р. за №1648/21960 НПАОП 73.1-1.11-12), «Правил охорони праці в лабораторіях ветеринарної медицини» № 67 від 20.04.99.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Регламенту (ЄС) № 396/2005 Європейського Парламенту і Ради від 23 лютого 2005 року щодо максимальних залишків пестицидів в або на харчових продуктах і кормах рослинного і тваринного походження, який вносить зміни до Директиви Ради № 91/414/ЄЕС;

ДСТУ ISO / ІЕС 17025:2019 Загальні вимоги до компетентності випробувальних і калібрувальних лабораторій (EN ISO/ІЕС 17025:2017, IDT; ISO/ІЕС 17025:2017, IDT);

SANTE/11312/2021 Analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Guidance document (Керівництво для аналітичного контролю якості оцінювання придатності методів аналізу пестицидів в продовольстві (сировині)).

Стокгольмська конвенція про стійкі органічні забруднювачі ратифікована Законом України N 949-V (949-16) від 18.04.2007, ВВР, 2007, N 30, ст.396, зареєстрованим в Мінюсті України від 20.02.17 р. за № 235/30103;

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. DDT, LINDANE, AND 2,4-D. 2017. VOLUME 113. (Монографії IARC про ідентифікацію канцерогенних небезпек для людини);

Настанова Eurachem "Придатність аналітичних методів для конкретного застосування. Настанова для лабораторій з валідації методів та суміжних питань": за ред. Б. Магнуссона та У. Ернемарка: переклад другого видання 2014 р. – К.: ТОВ "Юрка Любченка", 2016. - 92 с.

Наказ Міністерства аграрної політики № 289 від 25.06.2018, зареєстрований в Міністерстві юстиції України за № 857/32309 від 23.07.18 р. «Про затвердження Методів відбору зразків для визначення максимально допустимих рівнів залишків пестицидів у продуктах рослинного та тваринного походження для цілей державного контролю»;

Директива Комісії 2002/63/ЕС від 11 липня 2002 року про встановлення методів відбору для офіційного контролю залишків пестицидів у/на продуктах рослинного та тваринного походження;

Наказ МОЗ України № 55 від 02.02.2016 року про «ГІГІЄНІЧНІ НОРМАТИВИ І РЕГЛАМЕНТИ безпечного застосування пестицидів і агрохімікатів зареєстрований в Міністерстві юстиції України від 10 лютого 2016 р. за № 207/28337»;

Наказ МОЗ України № 368 від 13.05.2013 року про затвердження Державних гігієнічних правил і норм «Регламент максимальних рівнів окремих забруднюючих речовин у харчових продуктах» із змінами, зареєстрований в Міністерстві юстиції України від 18 травня 2013 р. за № 774/23306;

Ішвар Чандра Ядав. Класифікація пестицидів і їх вплив на людину та навколишнє середовище. Екологічна наука та інженерія. Вип. 6: Токсикологія. Розділ: 7. – Studium Press LLC, США – 2017. С. 140–158.

Державні санітарні правила та норми ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001 «Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті», затверджені Постановою Головного державного санітарного лікаря України N 137 від 20.09.2001 р.

ЧЕЧЕТ Ольга Миколаївна
кандидат ветеринарних наук, директор ДНДІЛДВСЕ,

ШУЛЯК Світлана Валеріївна,
кандидат ветеринарних наук, завідувач науково-дослідного хіміко-
токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ,

ОМЕЛЬЧУН Юля Анатоліївна,
начальник лабораторії газової хроматографії науково-дослідного хіміко-
токсикологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

КОБИШ Антоніна Іванівна,
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник лабораторії
газової хроматографії науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу
ДНДІЛДВСЕ

КЛОЧКОВА Наталія Павлівна,
провідний лікар ветеринарної медицини лабораторії газової
хроматографії науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу
ДНДІЛДВСЕ

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ОДНОЧАСНЕ ВИЯВЛЕННЯ ПЕСТИЦИДІВ ТА
НЕДІОКСИНОПОДІБНИХ ПОЛІХЛОРОВАНИХ БІФЕНІЛІВ В
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ І КОРМАХ, ЗОКРЕМА ПРОДУКТАХ
БДЖІЛЬНИЦТВА, МЕТОДОМ КАПЛЯРНОЇ ГАЗОВОЇ
ХРОМАТОГРАФІЇ**

В авторській редакції

Підписано до друку __.__.____ р. Формат _____
Папір друк. № 2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ____
Тираж ____ прим. Зам. №__

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видавця)