Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пиметрозина в семенах и масле рапса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3340—16

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 пиметрозина в семенах и масле рапса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3340—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств пиметрозина в семенах и масле рапса методом капиллярной газожидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2016.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1497—8

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (Т. В. Юдина, О. Е. Егорченкова, В. М. Волков).

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 26 февраля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Ю. А. Паршина
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 27.12.16

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25
Тираж 125 экз. Заказ 71

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
26 февраля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пиметрозина в семенах и масле рапса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3340—16

Свидетельство об аттестации МВИ № РОСС RU.0001.310430/0226.06.04.15 от 06.04.15.

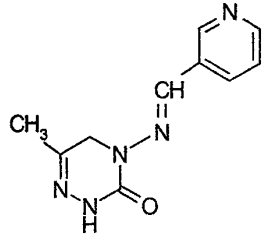
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода капиллярной газожидкостной хроматографии для измерения концентраций пиметрозина в семенах и масле рапса в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Пиметрозин

Химический класс – триазины.

6-метил-4-[(E)-(пиридин-3-илметилен)амино]-4,5-дигидро-2H-[1,2,4]-триазин-3-он (IUPAC).



Эмпирическая формула: $C_{10}H_{11}N_5O$.

Молекулярная масса: 217,2.

Бесцветный кристаллический порошок без запаха. Температура плавления 217 °С. Давление паров $4,2 \cdot 10^{-3}$ мПа (при 25 °С). Растворимость в органических растворителях (при 25 °С, мг/дм^3): в гексане < 1; этаноле 2 400, ацетоне – 94; дихлорметане – 1 200; этилацетате – 1 200. Растворимость в воде при 25 °С – 320 мг/дм^3 (pH 5), 270 мг/дм^3 (pH 7, 9) Коэффициент распределения в системе н-октанол–вода KOW logP = = –0,18.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс 5 820 мг/кг, (LD_{50}); острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 1,8 мг/дм^3 (4 ч).

Область применения. Пиметрозин – инсектицид системного действия, проникает через листовую поверхность в ткани растения. Рекомендуется для борьбы против сосущих и листогрызущих вредителей на злаковых культурах.

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.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций мг/дм^3, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm\delta$ %, $P = 0,95$	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в разных лабораториях), R, %
Семена рапса	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	3,2	4,5	9	13
Масло рапса	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	3,9	5,5	11	15

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

Таблица 2

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	полнота извлечения вещества, %	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, ±, %
Семена рапса	0,01	0,01—0,1	91,5	3,9	7,8
Масло рапса	0,01	0,01—0,1	89,6	3,7	7,3

2. Метод измерений

Метод основан на определении пиметрозина с использованием капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с масс-селективным (МСД) или термоионным детектором после извлечения вещества из анализируемых образцов смесью ацетонитрил–вода (80 : 20, по объему), очистки экстрактов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, на колонке с силикагелем и далее на концентрирующем патроне для твердофазной экстракции.

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 (± 2,5) мм рт. ст.

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

Газовый хроматограф, снабженный термоионным детектором с пределом детектирования по малатиону $0,2 \cdot 10^{-13}$ гР/с и автоматическим пробоотборником, предназначенный для работы с капиллярной колонкой ТУ 25-11-1645—84

Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %	
Весы аналитические, с пределом взвешивания 110 г и пределом допустимой погрешности 0,001 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
Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 100 $см^3$	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

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

3.2. Реактивы

Пиметрозин, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,5 %	
Азот газообразный (чистота 99,999 %) 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
Кальций хлористый (хлорид), хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 450—77
Кислота серная, концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Метанол (метиловый спирт), хч	ГОСТ 6995—77
Натрий сернокислый (сульфат) безводный, хч	ГОСТ 4166—76

Натрий хлористый (хлорид натрия), хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 4233—77
Натрий гидроксид (натр едкий), чда	ГОСТ 4328
Силикагель, для колоночной хроматографии (размер частиц 63—200 меш.), нейтральный, активный	
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора), хч	ГОСТ 22300—76
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	

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

3.3. Вспомогательные средства измерений, устройства, материалы

Аллонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами)	
Аппарат для встряхивания	ТУ 64-1-2851—78
Баня ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	ТУ 2504-1799—75
Баня водяная	
Бумажные фильтры средней и высокой плотности	ТУ 2642-001-05015242—07
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Воронки конусные диаметром 40—45 мм	ГОСТ 25336—82
Генератор водорода	
Груша резиновая	ТУ 9398-005-0576-9082—03
Гомогенизатор бытовой	
Компрессор	
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колбы плоскодонные вместимостью 100, 250, 500 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колбы круглодонные на шлифе (для упаривания) вместимостью 150 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Патроны концентрирующие для твердофазной экстракции, заполненные обращенно-фазным сорбентом с привитыми монофункциональными полярными группами С18, масса сорбента 0,36 г	
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	ГОСТ 25336—82

Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающий вакуум до 10 мбар	
Стаканы химические с носиком, вместимостью 100, 150 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Холодильник водяной обратный	
Хроматографическая капиллярная кварцевая колонка длиной 15 м, внутренним диаметром 0,25 мм, содержащая сорбент: 5 % – фенил- и 95 % – диметилполисилоксан (толщина пленки сорбента 0,25 мкм)	
Хроматографическая капиллярная кварцевая колонка длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, содержащая сорбент: 14 % – циан-пропилфенил и 86 % – дметилполисилоксан (толщина пленки сорбента 0,25 мкм)	

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 Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на газовый хроматограф.

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 на 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 «Правила устройства и безопасной эксплуатации стационарных компрессорных установок, воздухопроводов и газопроводов под давлением», ПБ-03-576-03. Запрещается открывать вентиль баллона, не установив на нем понижающий редуктор.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, прошедших обучение, освоивших методику, владеющих техникой, имеющих опыт работы на газовом хроматографе, и подтвердивших соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности по п. 13.

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 хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов, раствора внесения, установление градуировочной характеристики, приготовление смесей растворителей для экстракции и очистки экстрактов, подготовка концентрирующих патронов и колонки, на колонке с силикагелем и патронах, проверка поведения вещества на на колонке с силикагелем и патронах

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 ч, 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 окрашивать-

ся в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.4. Этилацетат

7.1.4.1. Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %. Навеску (25 ± 0,1) г натрия углекислого помещают в мерную колбу вместимостью 500 см^3, растворяют в бидистиллированной воде, доводят водой до метки, перемешивают.

7.1.4.2. Очистка растворителя. Растворитель промывают последовательно 5%-м водным раствором натрия углекислого, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над прокаленным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30. Хранят в темноте (в емкости из темного стекла) не более месяца.

7.2. Приготовление градуировочных растворов и раствора внесения

7.2.1. Исходный раствор пиметрозина для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,01 г пиметрозина, растворяют в 50—60 см^3 ацетона, доводят ацетоном до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение 3 месяцев.

7.2.2. Рабочий раствор № 1 пиметрозина для градуировки и внесения (концентрация 10,0 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10,0 см^3 исходного градуировочного раствора с концентрацией 100,0 мкг/см^3 (п. 7.2.1), доводят до метки ацетоном, тщательно перемешивают, получают рабочий раствор № 1 с концентрацией пиметрозина 10,0 мкг/см^3.

Раствор хранят в в морозильной камере при температуре –18 °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.

7.2.3. Рабочие растворы № 2—5 пиметрозина для градуировки (концентрация 0,05—0,5 мкг/см^3). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 0,5; 1,0; 2,0 и 5,0 см^3 рабочего раствора № 1 с концентрацией 10,0 мкг/см^3 (п. 7.2.2), доводят до метки ацетоном, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрациями пиметрозина 0,05; 0,1; 0,2 и 0,5 мкг/см^3.

Растворы хранят в холодильнике при температуре 4—6 °С в течение 7 дней.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую линейную (с угловым коэффициентом) зависимость площади пика от концентрации пиметрозина в растворе, устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В испаритель хроматографа вводят по 1 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений. Устанавливают площади пика пиметрозина, на основании которых строят градуировочную зависимость. Градуировочный график проверяют перед проведением измерений, анализируя один из градуировочных растворов. Если значения площадей отличаются более чем на 10 % от параметров градуировочной характеристики, ее строят заново, используя свежеприготовленные рабочие растворы для градуировки.

7.4. Приготовление 10 %-го раствора гидроксида натрия

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 г гидроксида натрия, растворяют в 60—70 см^3 деионизованной воды, доводят водой до метки, перемешивают. Хранят в емкости из пропилена не более 3 месяцев.

7.5. Приготовление смеси ацетонитрил–вода для экстракции

7.5.1. Смесь ацетонитрил–вода (объемное соотношение 8 : 2). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 80 см^3 ацетонитрила и 20 см^3 воды, перемешивают.

7.6. Приготовление смесей гексан–этилацетат для очистки экстрактов на колонке с силикагелем

7.6.1. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 9 : 1). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 90 см^3 гексана и 10 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.6.2. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 8 : 2). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 80 см^3 гексана и 20 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.6.3. Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 6 : 4). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 60 см^3 гексана и 40 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.7. Приготовление смесей метанол–вода для очистки водных образцов на концентрирующих патронах

7.7.1. Смесь метанол–вода (объемное соотношение 1 : 9). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 метанола и 90 см^3 воды, перемешивают.

7.8. Подготовка концентрирующих патронов

Патрон устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума*. Сверху в патрон устанавливают стеклянную пипетку вместимостью 5 см^3, используемую в качестве емкости для элюента.

Концентрирующий патрон промывают 5 см^3 метанола и 5 см^3 деионизированной воды, процедуру проводят с использованием вакуума, скорость потока растворителя через патрон не должна превышать 2 см^3/мин, при этом нельзя допускать высыхания поверхности патрона. Патрон готовят непосредственно перед использованием.

***Примечание.** В отсутствие специального аллонжа, жидкость продавливают через патрон с помощью шприца, скорость продавливания раствора не должна превышать 2—3 капли в секунду.

7.9. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстрактов

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм уплотняют тампоном из стекловаты, выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 4 г силикагеля в 20 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента, на который помещают слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку последовательно промывают смесью гексан–этилацетат в объемном соотношении 6 : 4, затем 8 : 2, порциями по 30 см^3, скорость прохождения растворителя 1—2 капли в секунду. Колонка готова к работе.

7.10. Проверка хроматографического поведения пиметрозина на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу вместимостью 150 см^3 помещают 0,5 см^3 рабочего раствора № 1 пиметрозина с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.2.2), упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 0,5 см^3 этилацетата, вносят 4,5 см^3 гексана, помещая на ультразвуковую баню на 40—60 с, и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды гексаном, порциями по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Колонку промывают последовательно 20 см^3 гексана,

20 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), элюаты отбрасывают.

Затем колонку промывают 60 см^3 смеси гексан–этилацетат (6 : 4, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см^3 ацетона и анализируют на содержание пиметрозина по п. 9.5.

Фракции, содержащие пиметрозин, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

7.11. Проверка поведения пиметрозина на концентрирующем патроне

В круглодонную колбу вместимостью 150 см^3 помещают 0,1 см^3 рабочего раствора № 1 пиметрозина для внесения с концентрацией 10,0 мкг/см^3 (п. 7.2.2), упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 1,0 см^3 метанола, добавляют 9,0 см^3 деионизованной воды, помещая на ультразвуковую баню на 30 с, перемешивают и наносят на подготовленный концентрирующий патрон (п. 7.8). Патрон промывают 5 см^3 смеси метанол–вода (1 : 9, по объему), элюат отбрасывают.

Патрон высушивают воздухом (с использованием вакуума) в течение 5 минут.

Пиметрозин элюируют с патрона 5 см^3 метанола, отбирая фракционно (по 2,5 см^3) элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см^3 ацетона, анализируют содержание пиметрозина по п. 9.5.

Фракции, содержащие пиметрозин, объединяют и вновь анализируют. Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с патрона и необходимый для очистки объем элюента.

Примечание. Проверку хроматографического поведения пиметрозина следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными: ГОСТ 10583—76 «Рапс. Требования при заготовках и поставках», ГОСТ 8988—2002 «Масло рапсовое. Технические условия» и ГОСТ 26313—84 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб»; «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окру-

жающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79).

Отобранные пробы семян рапса хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более недели. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Пробы масла анализируют в день приготовления.

Перед анализом образцы семена рапса измельчают на гомогенизаторе.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

9.1.1. Семена рапса.

Образец измельченных семян рапса массой 10 г, помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, добавляют смесь ацетонитрил–вода (80 : 20, по объему) в количестве 70 см^3 и помещают на аппарат для встряхивания на 1 час. Пробе дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной фильтр средней плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя 20 см^3 смеси ацетонитрил–вода (80 : 20, по объему), выдерживая каждый раз по 2 мин на ультразвуковой бане и 30 мин на аппарате для встряхивания. Осадок на фильтре промывают 10 см^3 той же смеси растворителей.

Объединенный отфильтрованный экстракт перемешивают и переносят в колбу для упаривания на 250 см^3, упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С до водного остатка (объем 5—10 см^3) и подвергают очистке перераспределением в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2, затем на колонке с силикагелем по п. 9.3 и на патроне по п. 9.4.

9.1.2. Масло рапса.

В коническую колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 г масла рапса и растворяют в 50 см^3 гексана. Полученный раствор переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 50 см^3 ацетонитрила, насыщенного гексаном, и встряхивают смесь в течение 2 мин. После полного разделения слоев нижний (ацетонитрильный) слой собирают в плоскодонную колбу объемом 250 см^3. Экстракцию повторяют дважды, используя по 30 см^3 ацетонитрила. Объединенный ацетонитрильный экстракт переносят в новую делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 20 см^3 гексана, насыщенного ацетонитрилом, и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения слоев нижний ацетонитрильный слой собирают в плоскодонную колбу

вместимостью 250 см^3, а верхний (гексан) отбрасывают. Ацетонитрильную фракцию возвращают в делительную воронку и повторяют процедуру еще раз, используя 30 см^3 гексана. Ацетонитрильный экстракт переносят в колбу для упаривания на 250 см^3, упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С досуха, далее очищают на колонке с силикагелем по п. 9.3 и на патроне по п. 9.4.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток, полученный по п. 9.1.1, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3. Колбу дополнительно обмывают 20 см^3 деионизованной воды, которую также переносят в воронку, вносят 10 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают, затем добавляют 20 см^3 гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний водный слой отделяют, переносят в коническую колбу. Верхний гексановый слой отбрасывают. Водную фазу вновь переносят в делительную воронку и повторяют операцию промывки, используя 10 см^3 гексана.

Далее водный экстракт помещают в другую делительную воронку, вместимостью 250 см^3, добавляют 30 см^3 этилацетата и интенсивно встряхивают 5 мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют через слой безводного сульфата натрия (толщиной около 1 см), помещенный на бумажном фильтре в конусной воронке, в круглодонную колбу вместимостью 150 см^3. Нижний водный слой возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию пиметрозина еще дважды порциями этилацетата объемом 20 см^3, встряхивая в течение 5 мин.

Безводный сульфат натрия, помещенный на фильтре дополнительно промывают 10 см^3 этилацетата.

Для полного разделения фаз содержимое воронки должно отстояться 10—15 мин. Следы этилацетата в водной фазе недопустимы, поскольку это снижает полноту извлечения вещества.

Объединенную органическую фазу, пропущенную через слой сульфата натрия, упаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток, полученный по п. 9.1.2 и 9.2, находящийся в круглодонной колбе, растворяют в 0,5 см^3 этилацетата, вносят 4,5 см^3 гексана и

помещают на ультразвуковую баню на 60 с. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.9. Колбу обмывают дважды смесью гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), приготовленной по п. 7.6.1, порциями по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Последовательно промывают колонку 20 см^3 гексана, 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему) и 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), элюаты отбрасывают.

Пиметрозин элюируют с колонки 60 см^3 смеси гексан–этилацетат (6 : 4, по объему), приготовленному по п. 7.6.3 со скоростью 1—2 капли в секунду, собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 150 см^3, раствор упаривают досуха при температуре не выше 35 °С, остаток подвергают дополнительной очистке на патроне по п. 9.4.

9.4. Очистка экстракта на концентрирующем патроне

Сухой остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.3, растворяют в 1,0 см^3 метанола, выдерживая 1 мин на ультразвуковой бане, затем добавляют 9,0 см^3 деионизованной воды, перемешивают и переносят на подготовленный концентрирующий патрон (п. 7.8). Патрон промывают 5 см^3 смеси метанол–вода (1 : 9, по объему), элюат отбрасывают. Патрон высушивают воздухом (с использованием вакуума) в течение 5 мин.

Пиметрозин элюируют 5 см^3 метанола в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 150 см^3. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетона и анализируют содержание пиметрозина по п. 9.5.

9.5. Условия хроматографирования

9.5.1. Газовый хроматограф с масс-селективным детектором.

Хроматографическая капиллярная кварцевая колонка длиной 15 м, внутренним диаметром 0,25 мм, содержащая сорбент: 5 % – фенил- и 95 % – диметилполисилоксан (толщина пленки сорбента 0,25 мкм).

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

Температура испарителя: 280 °С.

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 170 °С, выдержка 2 мин, нагрев колонки со скоростью 80 градусов в минуту до температуры 220 °С, выдержка 6 мин.

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

Давление – 95,69 кПа.

Средняя линейная скорость – 34,158 см/с.

Хроматографируемый объем: 1 мм^3.

Режим сканирования – SIM, m/z: 98,113.

Линейный диапазон детектирования: 0,05—0,5 нг.

9.5.2. Хроматограф газовый с термоионным детектором (альтернативный метод).

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

Температура испарителя: 220 °С, режим *Split* (азот): 59,7 см^3/мин, *gas saver*: 15 см^3/мин – 2 мин.

Температура детектора: 280 °С, водород – 3 см^3/мин, воздух – 60 см^3/мин, *makeup* (водород + гелий) – 5 см^3/мин.

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 40 °С, выдержка 5 мин, нагрев колонки со скоростью 5 градусов в минуту до температуры 70 °С, выдержка 0 мин, затем нагрев колонки со скоростью 20 градусов в минуту до температуры 160 °С.

Газ 1 (азот): давление 48,9 кПа, скорость 17 см/с, поток 0,6 см^3/мин.

Хроматографируемый объем: 1 мм^3.

Линейный диапазон детектирования: 0,01—0,1 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор пиметрозина с концентрацией 0,5 мкг/см^3, разбавляют ацетоном, не более чем в 50 раз.

10. Обработка результатов анализа

Содержание пиметрозина в пробе (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

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

X – содержание пиметрозина в пробе, мг/кг;

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

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;

m – масса 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:

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

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:

$(\bar{X} \pm \Delta)$, 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, табл. 1), %.

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

«*содержание пиметрозина в пробе менее 0,01мг/кг*»*

* 0,01 мг/кг – предел обнаружения пиметрозина в семенах рапса и масле рапса 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 пиметрозина в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,05 до 0,5 мкг/см^3.

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

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

X – концентрация пиметрозина в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора пиметрозина, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

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

Если величина расхождения (A) 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 пиметрозина, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.3.

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:

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

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

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

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), %.

gost.e-ecolog.ru