Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств флутриафола в семенах и масле рапса методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2402—08

Издание официальное

Москва • 2009

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 флутриафола в семенах и масле рапса методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2402-08

ББК 51.21
О 60

О 60 Определение остаточных количеств флутриафола в семенах и масле рапса методом газожидкостной хроматографии. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Рос потребнадзора, 2009. – 14 с.

1. Разработаны сотрудниками Всероссийского НИИ защиты растений (В.И. Долженко, И.А. Цибульская, Л.М. Карпова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 3 июля 2008 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 17 июля 2008 г.

4. Введены в действие с 1 сентября 2008 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз.

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Тиражировано отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г.Г. Онищенко
17 июля 2008 г.
Дата введения: 1 сентября 2008 г.

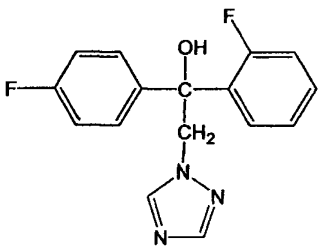
Определение остаточных количеств флутриафола в семенах и масле рапса методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2402-08

1. Вводная часть

Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения в семенах и масле рапса массовой концентрации флутриафола в диапазоне концентраций 0.025 - 0.25 мг/кг.

Флутриафол
Структурная формула:



CA: (±) -α-(2-фторфенил)-α-(4-фторфенил)-1H-1,2,4-триазол-1-этанол
Брутто формула: $C_{16}H_{13}F_2N_3O$
Мол. масса: 301.3

Химически чистый препарат - твердое белое кристаллическое вещество
Температура плавления: 130°С. Давление паров при 20^0С 7.1 $x10^{-6}$ mPa.
Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P=2.3 (20^0С)
Растворимость (20^0С): в воде 130 мг/дм^3, в ацетоне 190 г/дм^3, дихлорметане 150 г/дм^3, метаноле 69 г/дм^3, гексане 0.3 г/дм^3.
В почве период полураспада DT_{50} 65-125 дней.
Оральная токсичность (LD_{50}) для крыс 1480 мг/кг.

Гигиенические нормативы, МДУ (мг/кг): виноград – н.д., зерно хлебных злаков, свекла сахарная, яблоки, зерно кукурузы, просо, рис, горох, подсолнечник (семена и масло) – 0.05. Для семян и масла рапса гигиенические нормативы не установлены.

Область применения: фунгицид широкого спектра действия для борьбы с болезнями листа и колоса зерновых культур, также применяется для защиты плодовых, зернобобовых и других культур. Используется для борьбы с почвенными, семенными и аэрогенными инфекциями.

2. Методика определения флутриафола в семенах и масле рапса методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Принцип метода

Метод определения флутриафола в семенах и масле рапса основан на экстракции пестицида органическими растворителями и очистке перераспределением между двумя несмешивающимися жидкими фазами, а также, при необходимости, на колонке с силикагелем. Количественное определение проводят методом газожидкостной хроматографии с использованием термоионного детектора (ТИД).

2.1.2. Избирательность метода

Избирательность метода обеспечивается сочетанием условий подготовки проб и хроматографирования.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода

Метрологическая характеристика метода представлена в таблицах 1 и 2.

Метрологические параметры

Объект анализа	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, %	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
семена	0.025 – 0.1	50	5.4	15.1	16.6
семена	0.1 – 0.25	25	5.0	14.0	15.4
масло	0.025 – 0.1	50	5.9	16.5	18.2
масло	0.1 – 0.25	25	5.7	16.0	17.6

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для полного диапазона концентраций (n=20) приведены в таблице 2.

Таблица 2

Полнота извлечения флутриафола, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для n = 20, P = 0.95

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
семена	0.025	0.025-0.25	82.4	4.8	4.4
масло	0.025	0.025-0.25	81.5	5.2	4.7

2.2. Реактивы, материалы

Флутриафол, аналитический стандарт
Ацетон, о.с.ч.9-5, ТУ 2633-039-4493179-00 или ч.д.а., ГОСТ 2603-79
Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-76
н-Гексан, х.ч., ТУ 6-09-3375-78
Натрий сернокислый безводный, ч.д.а., ГОСТ 4166-76
Натрия хлорид, х.ч., ГОСТ 4233-77.
Стекловата.
Силикагель L 100/400 для хроматографии (0.040-0.063мм) (Хемапол, Венгрия)
Хлористый метилен, х.ч., ТУ-2631-020-11291058-96.

2.3. Приборы и посуда

Газовый хроматограф Цвет-550 М или аналогичный с ТИД и стеклянной насадочной колонкой, длиной 1м, внутренним диаметром 3 мм.

Ванна ультразвуковая УЗВ/100 ТН, ТУ 3.836.008 или аналогичная.

Весы аналитические типа ВЛА-200, ГОСТ 24104-2001.

Весы лабораторные типа ВЛКТ-500, ГОСТ 24104-2001.

Ротационный испаритель вакуумный Buchi R-205 или аналогичный.

Микрошприц МШ-10, МШ- 10М, ТУ 2-833-106.

Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147.

Насос водоструйный, ГОСТ 10696–75.

Колбы плоскодонные на шлифах КШ500 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.

Колбы круглодонные на шлифах КШ50 29-32 ТС, ГОСТ 10384-72.

Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25 336-82.

Воронки делительные на 500 $см^3$, ВД-3-500, ГОСТ 8613-75.

Цилиндры мерные на 100 $см^3$, 500$см^3$ ГОСТ 1774-74.

Колбы мерные на 100 $см^3$, ГОСТ 1770-74.

Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.

Стаканы химические, ГОСТ 25336-82Е.

Колонка стеклянная хроматографическая длиной 30 см, диаметром 10 мм.

2.4. Отбор проб

Отбор проб семян и масла рапса и сои - ГОСТ 10852-86 "Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб".

Для длительного хранения семена рапса подсушивают при комнатной температуре в отсутствие света. Сухие образцы могут храниться в течение года. Перед анализом пробы семян доводят до стандартной влажности и измельчают. Пробы масла рапса хранят в холодильнике при 0-4^{0}С в закрытой стеклянной таре не более 2-х месяцев.

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей

Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном вакуумном испарителе при температуре +40^{0}С до объема 1,0 см^3 и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками.

2.5.2. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа колонку, заполненную хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30, не присоединяя к детектору, кондиционируют в токе инертного газа (азот) при температуре 250^{0}С в течение 8-10 часов.

2.5.3. Приготовление стандартного и градуировочных растворов

Основной раствор флутриафола готовят, количественно перенося 10 мг аналитического стандарта флутриафола в мерную колбу на 100 см^3, растворяют навеску в ацетоне. Из полученного раствора флутриафола с концентрацией 100 мкг/см^3 готовят рабочие растворы с концентрациями 0.5 мкг/см^3, 1 мкг/см^3, 2 мкг/см^3, 4 мкг/см^3 последовательным разведением в ацетоне.

Для внесения в образец при определении полноты извлечения используют соответствующий раствор аналитического стандарта флутриафола в гексане.

2.5.4. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика зависимости высоты (площади) пика от концентрации флутриафола в растворе в хроматограф вводят по 2 мм^3 градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют высоты (площади) пиков и строят график зависимости среднего значения высоты, мм (площади, мв/сек) пика от концентрации флутриафола в градуировочном растворе (мкг/см^3).

2.5.5. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

Силикагель прогревают в термостате при 120^{0}С в течение 3-х часов и охлаждают до комнатной температуры. На дно стеклянной колонки помещают стекловату, слой 0.5 см безводного сульфата натрия и заполняют через воронку суспензией 5 г силикагеля в 25 см^3 гексана при открытом кране колонки, сверху наносят слой 1 см безводного сульфата натрия. Затем колонку промывают 10 см^3 смеси гексан : ацетон в соотношении 90 : 10 и закрывают кран, когда уровень растворителя достигнет верхнего края сорбента. Колонка готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения флутриафола на колонке с силикагелем

В подготовленную колонку пипеткой вносят 1 см^3 стандартного раствора флутриафола в гексане и дают впитаться. После этого в колонку вносят 10 см^3 смеси гексан : ацетон 60:40), элюат отбрасывают. Флутриафол элюируют 40 см^3 смеси гексан : ацетон (15:85), отбирая фракции по 5 см^3, упаривают досуха, остаток растворяют в 1 см^3 ацетона и хроматографируют Фракции, содержащие флутриафол, объединяют, выпаривают досуха, остаток растворяют в 1 см^3 ацетона и хроматографируют. Рассчитывают содержание флутриафола в элюате, определяя его полноту извлечения из колонки и необходимый для этого объем элюента.

Примечание: профиль вымывания флутриафола может изменяться при использовании силикагеля новой партии или другой марки.

2.5.7. Подготовка приборов и средств измерения

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями технической документации.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Экстракция и очистка экстрактов

2.6.1.1. Семена рапса. Навеску раздавленных в фарфоровой ступке семян (20 г) помещают в коническую колбу объемом 250 см^3, смачивают 50 см^3 теплой дистиллированной воды и оставляют на 30 мин для набухания. Затем добавляют 100 см^3 ацетона и экстрагируют флутриафол в ультразвуковой ванне в течение 15 мин. Экстракт фильтруют че-

рез фильтр "белая лента" на воронке Бюхнера. Экстракцию повторяют дважды. Объединенный фильтрат переносят в делительную воронку объемом 500 см^3, добавляют 30 см^3 гексана и встряхивают в течение 2-3 мин. После полного разделения фаз нижний водно-ацетоновый слой собирают, при этом эмульсию пограничного слоя разбивают непосредственно перед тем, как предстоит отбор эмульсионного слоя, внесением в него очень малого количества хлористого натрия. Оставшийся в делительной воронке гексановый слой промывают дважды 50 см^3 водного ацетона (50:50), который собирают. Объединенный водно-ацетоновый экстракт упаривают на роторном испарителе при температуре не выше 40^{0}С до объема 150-180 см^3 и переносят в делительную воронку. Флутриафол переэкстрагируют в хлористый метилен трижды порциями по 50 мл, встряхивая делительную воронку в течение 2-х минут. Нижний органический слой собирают, фильтруя через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетона и дальнейшую очистку проводят на колонке с силикагелем (п. 2.6.2).

2.6.1.2. Масло рапса. 20 г масла помещают в делительную воронку объемом 500 см^3, добавляют 100 см^3 смеси гексан : ацетон в соотношении 2 : 1 и осторожно круговыми движениями перемешивают в течение 2-3 минут. Затем добавляют 50 см^3 дистиллированной воды и встряхивают воронку в течение двух минут, происходит разделение слоев и перераспределение флутриафола в водно-ацетоновый слой, который собирают. К гексановому слою в делительной воронке добавляют 50 см^3 водного ацетона (50:50), интенсивно встряхивают и после полного разделения фаз собирают водно-ацетоновый слой. Промывку гексанового слоя повторяют. Собранный водно-ацетоновый экстракт упаривают на роторном испарителе при температуре не выше 40^{0}С до объема 120-150 см^3 и переносят в чистую делительную воронку. Флутриафол переэкстрагируют в хлористый метилен трижды порциями по 50 см^3. Органический слой фильтруют через безводный сульфат натрия и выпаривают досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 смеси гексан-ацетон (90:10) и дальнейшую очистку проводят на колонке с силикагелем (п.2.6.2).

2.6.2. Очистка экстрактов на колонке с силикагелем

Растворенный в 2 см^3 смеси гексан-ацетон (90:10) сухой остаток пипеткой количественно переносят в хроматографическую колонку,

колбочку ополаскивают еще 1-2 $см^3$ той же смеси и вносят в колонку, после чего открывают кран и дают раствору впитаться в сорбент. Затем в колонку вносят 10 $см^3$ смеси гексан - ацетон в соотношении 60:40, элюат отбрасывают. Флутриафол элюируют 15 $см^3$ смеси гексан: ацетон в соотношении 15 : 85, элюат собирают и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетона и хроматографируют.

2.6.3. Условия хроматографирования

Газовый хроматограф «Цвет-550М» с ТИД или аналогичный. Колонка стеклянная 1 м х 3 мм, заполненная хроматоном N-Super (0.125-0.160 мм) с 5% SE-30.

Температура колонки 220^0С, испарителя 240^0С, детектора 380^0С.

Скорость газа-носителя (азот) через колонку 35 $см^3$/мин.

Расход водорода 17 $см^3$/мин.

Расход воздуха 200 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы 2 $мм^3$. Время удерживания флутриафола 2.40 мин ±0.05 мин.

2.6.4. Обработка результатов анализа

Колличественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание флутриафола в пробе (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{H_2 \cdot C \cdot V}{H_1 \cdot P},$$

где H_1– высота (площадь) пика флутриафола в стандартном растворе, мм;

H_2 – высота (площадь) пика флутриафола в анализируемой пробе, мм;

V – объём экстракта, подготовленного для хроматографирования, $см^3$;

P – навеска анализируемого образца, г;

C – концентрация флутриафола в стандартном растворе, мкг/$см^3$.

Содержание остаточных количеств флутриафола в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2-х параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор флутриафола 100 мкг/$см^3$, разбавляют.

3. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости(1):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \leq r \qquad (1)$$

где 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.

4. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$$(\bar{X} \pm \Delta) \text{ мг/кг при вероятности } P=0.95,$$

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;
Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$$\Delta = \delta * X / 100,$$

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

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

"содержание вещества в пробе «менее нижней границы определения» (например: менее 0.025 мг/кг*, где *-0.025 мг/кг – предел обнаружения в семенах и масле рапса).

5. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

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

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

$$\Delta_л = \pm 0.84\ \Delta,$$

где Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

$$\Delta = \delta * X / 100,$$

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = X' - X - C_д,$$

где X', X, $C_д$ - среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п.4) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки, соответственно, мг/кг.

Норматив контроля К рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

5.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости:

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

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

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

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

6. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1005-88).

При выполнении измерений с использованием газового хроматографа и работе с электроустановками соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019-79 и инструкциями по эксплуатации приборов.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91.

7. Требования к квалификации оператора

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист-химик, имеющий опыт работы методом газожидкостной хроматографии, ознакомленный с руководством по эксплуатации хроматографа, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п.5.

8. Разработчики

Долженко В.И., Цибульская И.А., Карпова Л.М.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург.

gost.e-ecolog.ru