Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств хизалофоп-П-Этила в зеленой массе рапса, семенах и масле рапса и сои по основному метаболиту хизалофоп-П кислоте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2336—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 хизалофоп-П-Этила в зеленой массе рапса, семенах и масле рапса и сои по основному метаболиту хизалофоп-П кислоте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2336–08

ББК 51.21
О-60

О-60 **Определение** остаточных количеств хизалофоп-П-этила в зеленой массе рапса, семенах и масле рапса и сои по основному метаболиту хизалофоп-П кислоте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 14 с.

1. Разработаны Всероссийским НИИ защиты растений (В.И. Довженко, И.А. Цибульская, И.К. Журкович, Н.В. Луговкина, Н.Г. Ковров).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по защите прав потребителей и благополучия человека (протокол от 6 декабря 2007 г. № 3).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 15 февраля 2008 г.

4. Введены в действие с 10 апреля 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
15 февраля 2008 г.
Дата введения: 10 апреля 2008 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств хизалофоп-П-Этила в зеленой массе рапса, семенах и масле рапса и сои по основному метаболиту хизалофоп-П кислоте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2336–08

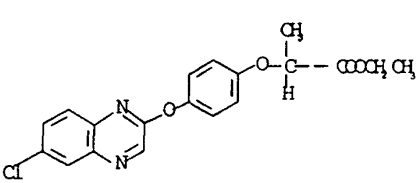
1. Вводная часть

Краткая характеристика препарата:

Действующее вещество (д.в.): хизалофоп-П-этил.

Название д.в. по номенклатуре ИЮПАК: (R)-2-[4-[(6-хлор-хиноксалин-2-илокси)-фенокси] пропионовой кислоты этиловый эфир.

Структурная формула д.в.:



Эмпирическая формула д.в.: $C_{19}H_{17}ClN_2O_4$.

Молекулярная масса д.в.: 372,8.

Химически чистое вещество: светло-коричневые кристаллы.

Температура плавления д.в.: 76-77^{0}С.

Давление пара д.в. при 20^{0}С: $1.1 \cdot 10^{-4}$ мПа.

Растворимость д.в. (г/л) при 20^{0}С: в воде - 0,0004, в гексане – 5,0, этаноле – 22, ксилоле – 360, ацетоне – 650.

Стабильность д.в.: устойчив к действию света и при нагревании, разлагается до хизалофоп-П кислоты в щелочной среде. В почве разлагается до хизалофоп –П кислоты, $T_{0.5} \leq 1$ дня.

Острая пероральная токсичность препаратов (LD_{50}) для крыс – 1180-1210 мг/кг, для мышей – 1750-1800 мг/кг. Не оказывает раздражающего действия на кожу.

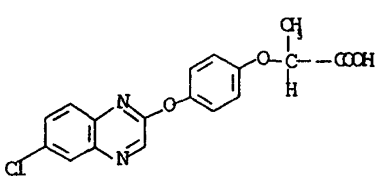
Гигиенические нормативы: ВМДУ в сое (семена, масло) – 0,05 мг/кг.

Область применения: гербицид системного действия, применяется для борьбы с однолетними и многолетними злаковыми сорняками на различных культурах, в том числе на посевах сои и рапса.

Краткая характеристика хизалофоп-П кислоты.

Название по номенклатуре ИЮПАК: (R)-2-[4-[(6-хлорхиноксалин-2-илокси)фен-окси] пропионовая кислота.

Структурная формула:



Эмпирическая формула д.в.: $C_{17}H_{13}ClN_2O_4$.

Молекулярная масса д.в.: 344,8.

2. Метод определения хизалофоп-П-этила в зеленой массе рапса, семенах и масле рапса и сои по основному метаболиту хизалофоп-П кислоте методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Область применения и принцип метода

Настоящий документ устанавливает метод определения остаточных количеств хизалофоп-П-этила в зеленой массе рапса, семенах и масле

рапса и сои в диапазоне концетраций 0,025-0,25 мг/кг. Метод основан на количественном определении хизалофоп-П кислоты, основного метаболита хизалофоп-П-этила, и включает извлечение остаточных количеств хизалофоп-П кислоты из анализируемого объекта органическими растворителями, очистку экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на патронах с силикагелем (Bond Elut). Количественное определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором.

2.1.2. Избирательность метода

Избирательность метода обеспечивается сочетанием условий подготовки проб и хроматографического анализа.

2.1.3. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и ее составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности P=0.95 не превышает значений, приведенных в таблице 1, для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 1

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, %
Зеленая масса рапса	0.025-0.1	50	4.6	12.9	15.5
-«-	0.1-0.25	25	3.6	10.1	12.1
Семена рапса	0.025-0.1	50	4.8	13.4	16.0
-«-	0.1-0.25	25	3.8	10.6	12.7
Масло рапса	0.025-0.1	50	5.0	14.0	16.8
-«-	0.1-0.25	25	4.2	11.8	12.9
Зерно сои	0.025-0.1	50	4.6	12.9	14.2
-«-	0.1-0.25	25	5.2	14.6	17.5
Масло сои	0.025-0.1	50	4.6	12.9	15.5
-«-	0.1-0.25	25	5.3	14.8	17.7

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

Таблица 2

Полнота извлечения, 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, ±, %
Зеленая масса	0.025	0.025-0.25	80.5	6.1	5.9
Семена рапса	0.025	0.025-0.25	81.5	5.2	4.9
Масло рапса	0.025	0.025-0.25	85.4	5.3	5.1
Семена сои	0.025	0.025-0.25	82.0	6.4	6.2
Масло сои	0.025	0.025-0.25	83.7	5.4	5.3

2.2. Реактивы, растворы, материалы

Аналитический стандарт хизалофоп-П кислоты.

Ацетон, осч, ТУ 2633-004-11291058-94.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, "В-230НМ" или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.

Вода бидистиллированная, ГОСТ 7602-72.

н-Гексан, х.ч., ТУ 2631-003-05807999-98, свежеперегнанный.

Кислота ортофосфорная, хч, ГОСТ 6552-80; 2М и 0.005М водный раствор.

Натрий сернокислый б/в, чда, ГОСТ 4166-76.

Натрий хлористый, чда, ГОСТ 4233-77.

Соляная кислота, хч, ГОСТ 3118-77.

Спирт метиловый, хч, ГОСТ 6995-77.

Стекловата.

Фильтры бумажные, красная лента, ТУ 2642-001-42624157-98.

Этиловый эфир уксусной кислоты, хч, ГОСТ 22300-76.

Эфир диэтиловый, ОСТ 84-2006-88.

Элюент № 1 для концентрирующего патрона: смесь этилацетат – метанол (80:20).

Элюент № 2 для концентрирующего патрона: смесь этилацетат – метанол (60:40, по объему).

Концентрирующие патроны Bond Elut марки SI Silica B, 500 мг (Varian) или заполненные силикагелем марки Kieselgel 60 (0.040-0.063) мм.

Подвижная фаза для ВЭЖХ: ацетонитрил – 0.005М ортофосфорная кислота (50:50).

2.3. Приборы, аппаратура, посуда

Жидкостный хроматограф "ACQUITY" фирмы «Waters» с быстросканирующим УФ детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или хроматограф «Breeze» с УФ-детектором или аналогичный.

Колонка ACQUITY UPLC BEH C-18, (100x2.1) мм, 1,7 мкм (Waters).

Аппарат для встряхивания, ТУ 64-1-1081-73 или аналогичный.

Баня ультразвуковая "Серьга" УЗМ002 или аналогичная.

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

Воронки делительные емкостью 250 и 500 $см^3$, ГОСТ 25336-82.

Воронки химические конусные, ГОСТ 25336-82.

Индикаторная бумага универсальная, ТУ 6-09-1181-76.

Колбы-концентраторы емкостью 100 и 250 $см^3$, ГОСТ 25336-82.

Колбы плоскодонные емкостью 100 и 300 $см^3$, ГОСТ 25336-82.

Колбы мерные со шлифом емкостью 25, 50, 100 $см^3$, ГОСТ 1770-74.

Насос водоструйный, ГОСТ 10696-75.

Ротационный вакуумный испаритель типа ИР-1 или аналогичный.

Пипетки мерные емкостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$, ГОСТ 20292-74.

Пробирки мерные со шлифом емкостью 5,0 $см^3$, ГОСТ 1770-74.

Стаканы химические на 100, 200 и 500 $см^3$, ГОСТ 25336-82.

Установка для упаривания растворителей в токе азота.

Шприц для ввода образцов в концентрирующий патрон.

2.4. Подготовка к определению

2.4.1. Подготовка растворителей и приготовление растворов

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.

Для приготовления 2М раствора ортофосфорной кислоты 200 г 98% (или 225 г 87%) кристаллической H_3PO_4 помещают в мерную колбу объемом 1 $дм^3$, растворяют в 600 $см^3$ дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Для приготовления 0.005М раствора ортофосфорной кислоты 2.5 $см^3$ 2М раствора H_3PO_4 вносят в мерную колбу на 1 $дм^3$ и доводят до метки деионизированной бидистиллированной водой.

Для приготовления подвижной фазы в колбе емкостью 1 $дм^3$ смешивают 500 $см^3$ ацетонитрила с 500 $см^3$ 0.005М раствора ортофосфорной кислоты.

2.4.2. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа колонку (ВЕН С-18) кондиционируют в потоке подвижной фазы (0.25 $см^3$/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1-2 часов.

2.4.3. Приготовление стандартных растворов

Основной раствор хизалофоп-П кислоты с содержанием 100 мкг/$см^3$ готовят растворением в ацетонитриле 0,01 г аналитического стандарта в мерной колбе емкостью 100 $см^3$. Раствор хранят в холодильнике при температуре +4-6^{0}С не более двух недель.

Градуировочные растворы с концентрациями 0.1 , 0.2, 0.5, 0.75 и 1.0 мкг/$см^3$ готовят из основного стандартного раствора хизалофоп-П кислоты последовательным разбавлением подвижной фазой для ВЭЖХ непосредственно в день проведения анализа.

При определении полноты извлечения хизалофоп-П-этила из модельных матриц используют растворы, приготовленные из основного стандартного раствора последовательным разбавлением ацетонитрилом.

2.4.4. Построение калибровочного графика

Для построения калибровочного графика в инжектор хроматографа вводят по 10 мкл приготовленных по п.2.4.2. растворов, содержащих хизалофоп-П кислоту. Осуществляют не менее трех параллельных измерений и находят среднее значение высоты (площади) хроматографического пика для каждой концентрации. Строят калибровочный график зависимости высоты (площади) хроматографического пика в мм (мв·сек) от концентрации хизалофоп-П кислоты в рабочем растворе в мкг/$см^3$.

2.4.5. Подготовка концентрирующего патрона для очистки экстракта

Концентрирующий патрон промывают последовательно с помощью шприца 5 $см^3$ бидистиллированной воды и 5 $см^3$ацетонитрила со скоро-

стью 5 см^3/мин. Затем промывают патрон 3 см^3 этилацетата. Элюаты отбрасывают.

2.5. Отбор и хранение проб

Отбор проб семян рапса и сои производится в соответствии с ГОСТ 10852-86. «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб». Семена хранят при комнатной температуре в полотняных мешочках, перед анализом доводят до стандартной влажности и измельчают. Масло рапса и сои хранят в холодильнике при температуре 0-4^{0}С в герметично закрытой стеклянной таре в течение 6 месяцев.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Экстракция хизалофоп-П

2.6.1.1. Зерно сои и зеленая масса и семена рапса

Навеску измельченных семян или зеленой массы рапса (10 г) помещают в плоскодонную колбу емкостью 250 см^3 и добавляют 100 см^3 смеси ацетонитрил-бидистиллированная вода (80:20, по объему) и помещают в УЗ-баню на 10 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Растительный материал повторно экстрагируют 50 см^3 той же смеси на УЗ-бане в течение 5 мин.

Из объединенного экстракта отбирают аликвоту (около 70 см^3), соответствующую 5 г зерна сои, семян или зеленой массы рапса. Дальнейшую очистку проводят по п.2.6.2.

2.6.1.2. Масло сои и рапса

Навеску масла (5 г) растворяют в 20 см^3 гексана в конической колбе на 150 см^3, затем приливают 50 см^3 80%-ного ацетонитрила и эмульсию энергично перемешивают в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. Ацетонитрильный слой осторожно декантируют в делительную воронку емкостью 200 см^3, а к оставшемуся маслу добавляют 50 см^3 80%-ного ацетонитрила и эмульсию перемешивают на аппарате для встряхивания 30 мин. Эмульсию количественно переносят в ту же делительную воронку, которую помещают в холодильник на 30 мин для четкого разделения слоев. Отделяют ацетонитрильную фазу и пропускают ее через слой ваты в грушевидную колбу емкостью 200 см^3. Дальнейшую очистку проводят по п. 2.6.2.

2.6.2. Очистка экстрактов.

2.6.2.1. Очистка переэкстракцией

Отобранные аликвоты экстрактов, полученных по п. 2.6.1, упаривают на роторном испарителе до объема 7-10 см^3 при температуре 40^{0}С. Водный остаток переносят в делительную воронку емкостью 100 см^3, приливают 15 см^3 бидистиллированной воды, 20 см^3 гексана и смесь встряхивают в течение 1 мин. Верхний органический слой отбрасывают. Водную фазу подкисляют 1н соляной кислотой до pH 2, переносят в делительную воронку, прибавляют 20 см^{3}диэтилового эфира и смесь встряхивают 1мин. Собирают органический слой, а экстракцию водной фазы повторяют дважды по 10 см^3 диэтилового эфира. Объединенную органическую фазу пропускают через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С.

2.6.2.2. Очистка на патронах с силикагелем

Остаток в колбе, полученный после упаривания очищенных по п. 2.6.2.1. экстрактов, растворяют в 2 см^3 этилацетата и раствор переносят на предварительно промытый 3 см^3 этилацетата концентрирующий патрон Bond Elut . Затем патрон промывают двумя порциями по 2 см^2 этилацетата и двумя порциями по 2 см^3 элюента №1 (смеси этилацетат-метанол = 80:20). Элюаты отбрасывают. Хизалофоп-П элюируют 4 см^3 элюента №2 (смеси этилацетат-метанол = 60:40). Элюат собирают в грушевидную колбу-концентратор и выпаривают досуха на роторном испарителе при температуре 30^{0}С.

Сухой остаток растворяют в 1.25 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ и 10 мм^3 вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.3. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с УФ-детектором Acuity (Waters, USA).

Колонка стальная длиной 10 см, внутренним диаметром 2.1 мм, заполненная октадецилсиликагелем зернением 1.7 мкм (BEH C18). Температура колонки 30±1^{0}С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.005М ортофосфорная кислота (50:50). Скорость потока элюента 0.25 см^3/мин.

Рабочая длина волны 235 нм.

Дозируемый объем 10 мм^3.

Линейный диапазон детектирования 1-10 нг.

Время удерживания хизалофоп-П кислоты 4,05±0,05мин.

2.7. Обработка результатов анализа

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки, содержание хизалофоп-П кислоты в пробе (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \cdot C \cdot V \cdot n}{S_1 \cdot P},$$

где S_1- высота (площадь) пика хизалофоп-П в стандартном растворе, мм (мв·сек);

S_2 - высота (площадь) пика хизалофоп-П в анализируемой пробе, мм (мв·сек);

V - объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, $см^3$;

P - навеска анализируемого образца, г;

C - концентрация стандартного раствора хизалофоп-П, $мкг/см^3$.

n – коэффициент, учитывающий отбор аликваты экстракта (n=2 для зерна сои, зеленой массы и семян рапса; n=1 для масла сои и рапса).

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор хизалофоп-П 1 $мкг/см^3$, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

Пересчет на содержание хизалофоп-П-этила (X_1) проводят по формуле: $X_1 = 1{,}08 \cdot X$

3. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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 0.005 мг/кг*, где *-0.005 мг/кг – предел обнаружения).

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):

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

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 жидкостного хроматографа и работе с электроустановками необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019-79 и требования инструкций 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 высокоэффективной жидкостной хроматографии, ознакомленный с руководством по эксплуатации хроматографа, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п.5.

gost.e-ecolog.ru