**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации**

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств тетраконазола в ягодах винограда и виноградном соке методом капиллярной газожидкостной хроматографии

**Методические указания**
**МУК 4.1.3211—14**

Издание официальное

**Москва • 2015**

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 тетраконазола в ягодах винограда и виноградном соке методом капиллярной газожидкостной хроматографии

***Методические указания***
**МУК 4.1.3211—14**

ББК 51.23
О62

О62 **Определение** остаточных количеств тетраконазола в ягодах винограда и виноградном соке методом капиллярной газожидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—19 с.

ISBN 978—5—7508—1430—5

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (В. А. Калинин, Т. С. Калинина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 26 июня 2014 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 30 июля 2014 г.

4. Введены впервые.

**ББК 51.23**

ISBN 978—5—7508—1430—5

**© Роспотребнадзор, 2015**
**© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015**

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
30 июля 2014 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Определение остаточных количеств тетраконазола в ягодах винограда и виноградном соке методом капиллярной газожидкостной хроматографии

## Методические указания МУК 4.1.3211—14

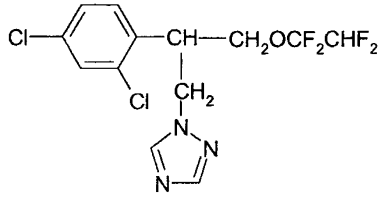
Свидетельство о метрологической аттестации № 01.00282-2008/0191.19.12.13 от 19.12.2013.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода капиллярной газожидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств тетраконазола в ягодах винограда и виноградном соке в диапазоне 0,25—2,5 мг/кг. Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: тетраконазол.

Название действующего вещества по ИЮПАК: (RS)-2-(2,4-дихлорфенил)-3-(1H-1,2,4-триазол-1-ил)пропил-1,1,2,2-тетрафторэтиловый эфир.

Структурная формула:




Эмпирическая формула: $C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$.

Молекулярная масса: 372,1.

Агрегатное состояние: вязкая жидкость.

Цвет, запах: бесцветная жидкость без запаха.

Плотность (при 20 °С): 1,432 г/см$^3$.

Давление паров: 0,18 мПа.

Температура плавления: 6 °С.

Температура кипения: 240 °С (с разложением).

Коэффициент распределения октанол–вода (при 20 °С): $K_{ow}$ log $P_{ow}$= = 3,56.

Растворимость в воде (мг/дм$^3$, при pH 7 и 20 °С): 156.

Растворимость в органических растворителях (г/дм$^3$, при 20 °С): метанол – более 52; этиловый спирт – 46,7; этилацетат – 42,2; 1,2-дихлорэтан – 41,7; ацетон – 40,3; ксилол – 29,9; гексан – 2,4.

Тетраконазол разлагается в разбавленных водных растворах при pH 4—9. Стабилен на солнечном свету в водных растворах.

*Краткая токсикологическая характеристика.* Тетраконазол относится к веществам мало опасным по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс от 1 031 до 1 248 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс более 2 000 мг/кг) и к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ (4 ч) для крыс 3 660 мг/м$^3$ воздуха).

*Область применения.* Тетраконазол – системный фунгицид широкого спектра действия с защитным, куративным и искореняющим действием. Абсорбируется корнями, листьями и стеблем, переносится акропетально во все части растения.

Применяется для борьбы с мучнистой росой, с бурой ржавчиной и различными пятнистостями листьев зерновых, с мучнистой росой и паршой яблонь, с мучнистой росой и пятнистостью листьев сахарной свеклы, с мучнистой росой виноградников и огурцов, с мучнистой росой и ржавчиной на овощных и декоративных культурах.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,003 мг/кг массы человека; ПДК в воде водоемов – 0,01 мг/ дм$^3$; ОДК в почве – 0,4 мг/кг; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,6 мг/м$^3$, в атмосферном воздухе – 0,003 мг/м$^3$; МДУ в продукции (мг/кг): зерно хлебных злаков – 0,2, сахарная свекла – 0,05.

## 1. Погрешностьизмерений

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и ее составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не превышает значений, приведенных в табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительные интервалы среднего результата для полного диапазона концентраций ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 1

**Метрологические параметры для тетраконазола**

| Анализируемый объект | Диапазон определяемых концентраций, мг/кг | Показатель точности (граница относительной погрешности) ± δ, % $P$=0,95 | Стандартное отклонение повторяемости, $\sigma_r$, % | Предел повторяемости, $r$, % | Предел воспроизводимости, $R$, % |
|---|---|---|---|---|---|
| Ягоды винограда | 0,2—2,5 вкл. | 25 | 5,71 | 15,87 | 22,22 |
| Виноградный сок | 0,25—2,5 вкл. | 25 | 7,05 | 19,60 | 27,44 |

Таблица 2

**Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для тетраконазола**

| Анализируемый объект | Метрологические параметры, $P$ = 0,95, $n$ = 20 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Предел обнаружения, мг/кг | Диапазон определяемых концентраций, мг/кг | Полнота извлечения вещества, % | Стандартное отклонение S, % | Доверительный интервал среднего результата, ±, % |
| Ягоды винограда | 0,25 | 0,25—2,5 | 83,80 | 3,56 | 1,40 |
| Виноградный сок | 0,25 | 0,25—2,5 | 85,14 | 4,60 | 1,83 |

## 2. Метод измерений

Метод основан на определении тетраконазола методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с использованием капиллярной колонки с детектором по захвату электронов после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на колонках с флоризилом.

Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Специфичность обеспечивается подбором колонки и условий программирования.

## 3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

### *3.1. Средства измерений*

| | |
|---|---|
| Весы аналитические класса точности по ГОСТ Р 53228—08 – специальный (I), с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г | |
| Весы лабораторные общего назначения класса точности по ГОСТ Р 53228—08 – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г | |
| Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |
| Микрошприц объемом 10 $мм^3$ со шкалой деления 0,1 $мм^3$ и погрешностью измерения вытесняемого объема ± 1 % | |
| Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$ | ГОСТ 29227—91 |
| Хроматографическая система, включающая: – хроматограф газовый с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов $^{63}Ni$ с пределом детектирования по Линдану $4 \times 10^{-14}$ г/$см^3$ и приспособлениями для капиллярной колонки; – компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ | |
| Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$ | ГОСТ 1770—74 |

**Примечание.** Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

### *3.2. Реактивы*

| | |
|---|---|
| Тетраконазол, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 96,5 % | CAS 112281-77-3 |
| Азот, осч | ГОСТ 9293—74 |
| Ацетон, осч | ТУ 6-09-3513—86 |

| | |
|---|---|
| Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм | ТУ 6-09-2167—84 |
| Вода дистиллированная и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной емкости) | ГОСТ 6709—72 |
| Гелий, очищенный | ТУ 51-940—80 |
| n-Гексан, хч | ТУ 6-09-3818—89 |
| Калий марганцово-кислый, чда | ГОСТ 20490—75 |
| Метилен хлористый, хч | ТУ 6-09-2662—77 |
| Натрий серно-кислый, безводный, хч | ГОСТ 4166—76 |
| Натрий хлористый, хч | ГОСТ 4233—77 |
| Флоризил (магния силикат, 99 %, CAS 1343-88-0) для колоночной хроматографии, зернение 60/100 меш. | |

**Примечание.** Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

### *3.3. Вспомогательные устройства и материалы*

| | |
|---|---|
| Аппарат для встряхивания проб с возвратно-поступательным направлением колебаний, с максимальной загрузкой 10 кг, с амплитудой колебаний 30 мм и скоростью от 10 до 300 колебаний в минуту | |
| Банки полипропиленовые с крышками для экстракции вместимостью 250 $см^3$ | |
| Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная | ГОСТ 5556—81 |
| Воронки делительные на 250 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Воронки лабораторные, стеклянные | ГОСТ 25336—82 |
| Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, с диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 $см^3$, с изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, с водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 $дм^3$ и с диапазоном температур от 20 до 100 °С | |
| Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 $см^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 и 4 000 $см^3$ ТС | ТУ 92-891.029—91 |

| | |
|---|---|
| Колонка хроматографическая капиллярная из кварцевого стекла, с внутренний диаметром 0,25 мм, длиной 30 м и толщиной пленки 0,25 мкм | |
| Насос диафрагменный, химически стойкий на 100 %, с мощностью электропривода 245 Вт, предельным вакуумом 100 мбар/абс., с избыточным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 дм$^3$/мин | |
| Стаканы стеклянные, термостойкие объемом 100—2 000 см$^3$ | ГОСТ 25336—82 |
| Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом 4 000 см$^3$ и приемной конической колбой объемом 1 000 см$^3$ | |
| Фильтры обеззоленные нейтральные, быстро фильтрующие, диаметром 11 см, зольность одного фильтра 0,00072 г | ТУ 6-09-1678—86 |

**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 электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 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—90 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313—03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

## 5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения анализа, освоившие метод анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы контроля при проведении процедуры контроля погрешности анализа.

## 6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С, относительной влажности не более 80 % и нормальном атмосферном давлении;

– выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

## 7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка колонок с флоризилом для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с флоризилом, установление градуировочной характеристики.

### *7.1. Подготовка органических растворителей*

#### *7.1.1. Очистка ацетонитрила*

Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 ч. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей.

Ацетонитрил перегоняют при температуре 81,5 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 81,5 °С, отбрасывают.

#### *7.1.2. Очистка ацетона*

Ацетон помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к нему марганцово-кислый калий из расчета 1 г/дм$^3$.

Ацетон перегоняют при температуре 56,2 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 56,2 °С, отбрасывают.

#### *7.1.3. Приготовление бидистиллированной воды*

Дистиллят помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к нему марганцово-кислый калий из расчета 1 г/дм$^3$ и кипятят в течение 6 ч.

Собирают фракции, отогнанные при температуре 100,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 100,0 °С, отбрасывают.

*7.1.4. Очистка хлористого метилена*

Хлористый метилен промывают равным объемом 5 %-го раствора натрия углекислого (безводного), осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм$^3$. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 ч. Затем хлористый метилен сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см$^3$ аппарата для перегонки растворителей. Хлористый метилен перегоняют при температуре 40,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 40,0 °С, отбрасывают.

***7.2. Приготовление растворов для проведения анализа***

*7.2.1. Приготовление рабочих растворов*

*7.2.1.1. Приготовление 2 % раствора сульфата натрия.*

В мерную колбу на 1 000 см$^3$ переносят 20 г гидрокарбоната натрия, добавляют 200—300 см$^3$ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения и доводят водой объем в колбе до метки.

*7.2.2. Приготовление градуировочных растворов*

*7.2.2.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией тетраконазола 1,0 мг/см$^3$.*

Взвешивают 50 мг тетраконазола в мерной колбе объемом 50 см$^3$. Навеску растворяют в ацетоне и доводят объем до метки ацетоном. Полученный стандартный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и для установления градуировочной характеристики. Раствор хранится в холодильнике около 120 суток.

*7.2.2.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией тетраконазола 10,0 мкг/см$^3$.*

Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 100 см$^3$ и доводят объем до метки ацетоном. Стандартный раствор № 2 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики и для внесения в контрольные образцы. Раствор может храниться в холодильнике не более 30 суток.

*7.2.2.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией тетраконазола 5,0 мкг/см$^3$.*

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 5 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетоном. Стандартный раствор № 3 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики и для вне-

сения в контрольные образцы. Раствор может храниться в холодильнике не более 30 суток.

*7.2.2.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией тетраконазола 2,5 мкг/см$^3$.*

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетоном. Стандартный раствор № 4 используется для установления градуировочной характеристики и для внесения в контрольные образцы. Раствор может храниться в холодильнике не более 30 суток.

*7.2.2.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией тетраконазола 1,0 мкг/см$^3$.*

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетоном. Стандартный раствор № 5 используется для установления градуировочной характеристики и для внесения в контрольные образцы. Раствор может храниться в холодильнике не более 30 суток.

*7.2.2.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией тетраконазола 0,5 мкг/см$^3$.*

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетоном. Стандартный раствор № 6 используется для установления градуировочной характеристики и для внесения в контрольные образцы. Раствор может храниться в холодильнике не более 30 суток.

*7.2.2.7. Стандартный раствор № 7 с концентрацией тетраконазола 0,25 мкг/см$^3$.*

Из стандартного раствора № 4 отбирают пипеткой 1 см$^3$, помещают в мерную колбу объемом 10 см$^3$ и доводят объем до метки ацетоном. Стандартный раствор № 7 используется для установления градуировочной характеристики и для внесения в контрольные образцы. Раствор может храниться в холодильнике не более 30 суток.

### *7.3. Установление градуировочной характеристики*

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации тетраконазола в растворе (мкг/см$^3$), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки с концентрацией 2,5; 1,0; 0,5 и 0,25 мкг/см$^3$.

В испаритель хроматографа вводят по 1 мм$^3$ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

По полученным данным строят градуировочный график зависимости площади хроматографического пика (мВ) от концентрации тетраконазола в растворе (мкг/см$^3$).

### *7.4. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения тетраконазола на ней*

*7.4.1. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта*

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 4 г флоризила с зернением 60/100 меш. и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. На слой флоризила наносят слой безводного серно-кислого натрия толщиной 1 см.

За день перед использованием колонку промывают 20 см$^3$ ацетона, тщательно отжимают, а непосредственно перед использованием колонку промывают 10 см$^3$ гексана.

*7.4.2. Проверка хроматографического поведения тетраконазола на колонке с флоризилом*

В концентратор объемом 100 см$^3$ вносят 1 см$^3$ стандартного раствора тетраконазола в ацетоне с концентрацией 10 мкг/см$^3$ и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см$^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 9 см$^3$ гексана, перемешивают и наносят на подготовленную колонку. Элюат собирают в концентратор и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Исходную колбу обмывают 5 см$^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 9 : 1, вносят на колонку. Затем колонку последовательно промывают пятью порциями смеси гексана с ацетоном в соотношении 1 : 1 объемом 5 см$^3$ каждая. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 1 см$^3$ ацетона и 1 мм$^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие тетраконазол, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

Изучение поведения тетраконазола на колонке проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии флоризила.

## 8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых про-

дуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» № 2051-79 от 21.08.79, а также в соответствии с ГОСТ 25896—83 «Виноград свежий столовый. ТУ» и ГОСТ 656—79 «Соки плодовые и ягодные натуральные. ТУ».

Пробы ягод винограда хранят в холодильнике в полиэтиленовых пакетах при температуре 0—4 °С не более суток. Для длительного хранения пробы замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильнике при температуре –18 °С до 2-х лет.

Пробы виноградного сока хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4 °С не более 10 суток.

## 9. Выполнение определения

### *9.1. Ягоды винограда*

#### *9.1.1. Экстракция*

Образец измельченных ягод винограда массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см$^3$, прибавляют туда 50 см$^3$ ацетонитрила и помещают на аппарат для встряхивания проб на 30 мин. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 см$^3$ через фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя каждый раз по 50 см$^3$ ацетонитрила и помещая на 15 мин на аппарат для встряхивания проб. Экстракты фильтруют и объединяют в концентраторе объемом 250 см$^3$, выпаривают до водного остатка при температуре не выше 30 °С.

#### *9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей*

К водному остатку в концентраторе, полученному по п. 9.1.1, прибавляют 50 см$^3$ 2 % раствора сульфата натрия, тщательно обмывая стенки концентратора, и переносят смыв в делительную воронку объемом 250 см$^3$. Затем концентратор обмывают еще 50 см$^3$ 2 % раствора сульфата натрия, и все смывы объединяют в делительной воронке.

Тетраконазол экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 50 см$^3$, каждый раз встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) собирают в концентратор объемом 250 см$^3$ через слой безводного сульфата натрия. Осушитель обмывают 10 см$^3$ хлористого метилена, объединяют смыв с основным экстрактом и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку пробы на колонках с флоризилом.

*9.1.3. Очистка экстракта на колонке с флоризилом*

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 1 $см^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 9 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на подготовленную колонку. Колонку промывают 5 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 9 : 1, элюаты отбрасывают. Тетраконазол элюируют с колонки 15 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 1 : 1, элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$ и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 10 $см^3$ ацетона и 1 $мм^3$ раствора вводят в хроматограф.

### *9.2. Виноградный сок*

*9.2.1. Экстракция*

Навеску виноградного сока массой 10 г помещают в делительную воронку объемом 250 $см^3$, добавляют 20 $см^3$ насыщенного раствора хлорида натрия, перемешивают содержимое воронки, приливают 50 $см^3$ ацетонитрила и встряхивают содержимое воронки в течение двух минут. После разделения фаз нижний слой сливают в стакан объемом 100 $см^3$, а ацетонитрил пропускают через безводный сульфат натрия и собирают в концентратор объемом 250 $см^3$. Водно-солевую фазу из стакана возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию тетраконазола в ацетонитрил еще 2 раза, используя каждый раз по 30 $см^3$ ацетонитрила и встряхивая смесь в течение двух минут. Объединенный ацетонитрильный экстракт выпаривают до водного остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по схеме, указанной в п.п. 9.1.2 «Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей» и 9.1.3 «Очистка экстракта на колонке с флоризилом».

Сухой остаток растворяют в 10 $см^3$ ацетона и 1 $мм^3$ раствора вводят в хроматограф.

### *9.3. Условия хроматографирования*

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф газовый с детектором постоянной скорости рекомбинации ионов $^{63}Ni$ с пределом детектирования по Линдану $4 \times 10^{-14}$ $г/см^3$ и приспособлениями для капиллярной колонки;

– компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее

обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ.

Колонка хроматографическая капиллярная из кварцевого стекла, с внутренний диаметром 0,25 мм, длиной 30 м и толщиной пленки 0,25 мкм.

Температура термостата колонки программированная: начальная температура – 160 °С, выдержка 2 мин, нагрев колонки по 10 °С в минуту до 240 °С, выдержка 5 мин.

Температура испарителя – 260 °С, детектора – 320 °С.

Газ 1 – гелий (газ-носитель), регулятор расхода гелия – РРГ-10, давление на входе – 110 кПа, линейная скорость – 24,585 см/с, давление на выходе – 101,3 кПа; поток через колонку – 1,1376 $см^3$/мин; мертвое время – 2,02 мин.

Газ 2 – гелий (сброс пробы), регулятор расхода гелия – РРГ-11, режим – сплитлесс, расход во время анализа – 10 $см^3$/мин, деление потока – 1 : 30, начало сброса – 1 мин, длительность сброса – 2 мин.

Газ 4 – азот (поддув в детектор), расход во время анализа – 35 $см^3$/мин.

Продувка детектора и испарителя азотом после анализа – по 55 $см^3$/мин в течение 3 мин при температуре колонки 270 °С.

Объем вводимой пробы: 1 $мм^3$.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 0,25—2,5 нг.

## 10. Обработка результатов

Содержание тетраконазола в пробах ягод винограда и виноградном соке рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} \cdot P \text{, где}$$

$X$ – содержание тетраконазола в пробе, мг/кг;

$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мВ;

$S_{пр}$ – высота (площадь) пика образца, мВ;

$A$ – концентрация стандартного раствора, мкг/$см^3$;

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

$m$ – масса анализируемого образца, г ($см^3$);

$P$ – содержание тетраконазола в аналитическом стандарте, %.

## 11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

$r$ – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8 \times \sigma_r$.

При невыполнении условия (1) выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

## 12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$(\bar{X} \pm \Delta)$ мг/кг при вероятности $P = 0{,}95$, где

$\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

$\Delta$ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

$\delta$ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

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

«*содержание вещества в пробе менее 0,25 мг/кг*».*

* – 0,25 мг/кг – предел обнаружения.

## 13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений, а также контроль стабильности градуировочной характеристики 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.

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

Контроль стабильности градуировочной характеристики для тетраконазола проводят при смене основного градуировочного раствора № 1 каждые 4 месяца, при смене основных градуировочных растворов № 2, 3, 4, 5, 6 и 7 – каждый месяц, а также в начале и при окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание тетраконазола в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,25 до 2,5 мкг/см$^3$.

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

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 0{,}95, \text{ где}$$

$X$ – концентрация тетраконазола контрольного измерения, мкг/см$^3$;

$C$ – известная концентрация градуировочного раствора тетраконазола в ацетоне, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см$^3$;

0,95 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (А) превышает 0,95 %, 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 тетраконазола, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится методом добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta, \text{ где}$$

$\Delta$ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

$\delta$ – 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 и 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:

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

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 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 ($R$):

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

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

$R$ – предел воспроизводимости (в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Приложение 1

**Полнота извлечения тетраконазола из ягод винограда и виноградного сока**
**(5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)**

| Среда | Внесено тетраконазола, мг/кг | Обнаружено тетраконазола, мг/кг | Полнота определения,% |
|---|---|---|---|
| Ягоды винограда | 0,25 | 0,2086 ± 0,0081 | 83,4 |
| | 0,50 | 0,4126 ± 0,0072 | 82,5 |
| | 1,00 | 0,8456 ± 0,0334 | 84,6 |
| | 2,50 | 2,1167 ± 0,1500 | 84,7 |
| Виноградный сок | 0,25 | 0,2125 ± 0,0109 | 85,0 |
| | 0,50 | 0,4176 ± 0,0366 | 83,5 |
| | 1,00 | 0,8542 ± 0,0527 | 85,4 |
| | 2,50 | 2,1656 ± 0,0437 | 86,6 |

**Определение остаточных количеств тетраконазола в ягодах винограда и виноградном соке методом капиллярной газожидкостной хроматографии**

**Методические указания**
**МУК 4.1.3211—14**

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Н. В. Кожока
Компьютерная вёрстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 6.11.15

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25
Тираж 125 экз. Заказ 63

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

gost.e-ecolog.ru