Государственное санитарно-эпидемиологическое
нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания протиоконазола по метаболиту протиоконазол-дестио в зерне, масле и зеленой массе кукурузы, семенах и масле льна, зерне и зеленой массе гороха, зерне и соломе проса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3196—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

Измерение остаточного содержания протиоконазола по метаболиту протиоконазол-дестио в зерне, масле и зеленой массе кукурузы, семенах и масле льна, зерне и зеленой массе гороха, зерне и соломе проса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3196—14

ББК 51.23
И37
И37 **Измерение** остаточного содержания протиоконазола по метаболиту протиоконазол-дестио в зерне, масле и зеленой массе кукурузы, семенах и масле льна, зерне и зеленой массе гороха, зерне и соломе проса методом капиллярной газожидкостной хроматографии —М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—23 с.

ISBN 978—5—7508—1376—6

1. Разработаны сотрудниками ГНУ Всероссийского НИИ фитопатологии (Л. В. Дубовая, А. М. Макеев).
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 29 июля 2014 г.
4. Введены впервые.

ББК 51.23

© **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
29 июля 2014 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Измерение остаточного содержания протиоконазола по метаболиту протиоконазол-дестио в зерне, масле и зеленой массе кукурузы, семенах и масле льна, зерне и зеленой массе гороха, зерне и соломе проса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1. 3196—14

Свидетельство о метрологической аттестации от 03.10.2013 № 01.00225/205-28-13

1. Назначение и область применения

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода капиллярной газожидкостной хроматографии для определения массовых концентраций протиоконазола по метаболиту протиоконазол-дестио в зеленой массе кукурузы и гороха, соломе проса в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг, в зерне гороха и проса, зерне и масле кукурузы в диапазоне 0,02—0,2 мг/кг, в семенах и масле льна в диапазоне 0,025—0,25 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

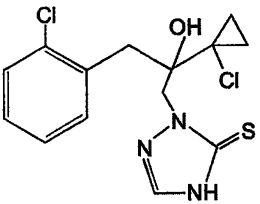
Протиоконазол.

2-[(2RS)-2-(1-хлорциклопропил)-3-(2-хлорфенил)-2-окси-пропил]-2Н-1,2,4-триазол-3(4Н)-тион.

Эмпирическая формула: $C_{14}H_{15}Cl_2N_3OS$.

Молекулярная масса 344,3.

Структурная формула:



Бесцветное или светло-бежевое твердое вещество без запаха. Температура плавления: 139,1—144,5 °С. Давление паров при 20 °С: $<< 4 \times 10^{-7}$ Па. Коэффициент распределения н-октанол/вода: $K_{OW}\log P = 4{,}16$ (pH 4), 3,82 (pH 7) и 2,0 (pH 9). Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: ацетон – >250, этилацетат – > 250, дихлорметан – 88, ацетонитрил – 69; растворимость в воде – 0,005 (pH 4), 0,3 (pH 8) и 2,0 (pH 9).

Вещество стабильно при хранении на воздухе, а также в кислой ($DT_{50} = 120$ дней) и щелочной ($DT_{50} \geq 1$ года) средах.

В присутствии света в водных фотолитических условиях протиоконазол достаточно быстро деградирует с периодом полураспада 47,7 ч.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – > 6 200 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – > 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – > 4 990 мг/м^3 воздуха.

Протиоконазол не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистую оболочку глаз, не обладает эмбриотоксическим или тератогенным действием. LC_{50} для рыб – 1,83 мг/дм^3 (96 ч).

Фунгицид нетоксичен для птиц, пчел, дождевых червей, дафний и почвенных микроорганизмов.

Оновной метаболит протиоконазола

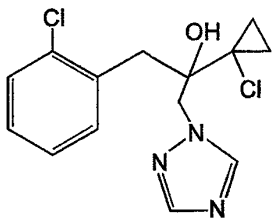
Протиоконазол-дестио (SXX 0665).

α-(1-хлорциклопропил)-α-(2-хлорфенил)метил-1Н-1,2,4--триазол-1-этанол.

Эмпирическая формула: $C_{14}H_{15}Cl_2N_3O$.

Молекулярная масса 312,2.

Структурная формула:



Бесцветный порошок без запаха. Температура плавления: 108,5 °С. Давление паров при 20 °С: $2,7 \times 10^{-7}$ Па. Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log P = 3,04. Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: гексан – 3, толуол – 84, ацетон – 100, ацетонитрил – 43, дихлорметан – более 200, вода – 0,051.

Метаболит стабилен в кислой и щелочной средах ($DT_{50} \geq$ 500 ч).

Область применения препарата

Протиоконазол – фунгицид системного действия из группы ингибиторов синтеза эргостерина. Вещество обладает защитным, искореняющим и лечебным действием.

Применяется в России в качестве фунгицида системного действия в составе смесевых препаратов для протравливания зерна колосовых культур и обработки вегетирующих растений зерновых злаков и рапса с нормой расхода 37—50 г д.в./т семян или 80—100 г д.в./га.

Проходит регистрационные испытания в Российской Федерации в качестве фунгицида в составе смесевых препаратов для протравливания зерна гороха и проса и семян льна с нормой расхода до 82,5 г д.в./т, а также для однократной обработки посевов кукурузы при норме расхода до 125 г д.в./га.

Протиоконазол весьма лабильное вещество и при поступлении в растение очень быстро метаболизируется до более устойчивого соединения – протиоконазол-дестио (α-(1-хлорциклопропил)-α-(2-хлорфенил)метил-1Н-1,2,4-триазол-1-этанол). В связи с этим разработан метод, позволяющий осуществлять контроль за содержанием остаточных количеств протиоконазола в зеленой массе растений, зерне кукурузы, гороха и проса, семенах и масле льна по протиоконазол-дестио.

2. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значение погрешности (и ее составляющие) результатов измерений не превышает значений, приведенных в таблице.

Таблица

Анализируемый объект	Диапазон измерений массовой доли протиоконазол-дестио, мг/кг	Показатель точности (границы относительной погрешности) ±δ, % при P = 0,95	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), δ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), δ_R, %	Предел повторяемости, r, %, P = 0,95, n = 2	Предел воспроизводимости, R, %, P = 0,95, n = 2
Зеленая масса кукурузы	От 0,05 до 0,10 включ.	24	5	9	14	23
	Св. 0,10 до 0,50 включ.	13	3	4,5	8	12
Зерно кукурузы	От 0,020 до 0,10 включ.	40	8	12	22	33
	Св. 0,10 до 0,20 включ.	26	6	9	17	23
Масло кукурузы	От 0,020 до 0,10 включ.	36	7	11	19	30
	Св. 0,10 до 0,20 включ.	24	5	8	14	22
Семена льна	От 0,025 до 0,10 включ.	38	7	11	19	30
	Св. 0,10 до 0,25 включ.	29	5	8	14	22
Масло льна	От 0,025 до 0,10 вкл.	36	7	11	19	30
	Св. 0,10 до 0,25 включ.	24	5	9	14	23
Зеленая масса гороха	От 0,05 до 0,10 включ.	25	6	9	17	23
	Св. 0,10 до 0,50 включ.	16	3	4,5	8	12
Зерно гороха	От 0,020 до 0,10 включ.	40	7	11	19	30
	Св. 0,10 до 0,20 включ.	28	4	6	11	17
Зерно проса	От 0,020 до 0,10 включ.	30	6	9	17	23
	Св. 0,10 до 0,20 включ.	20	3	4,5	8	12
Солома проса	От 0,05 до 0,10 включ.	30	6	9	17	23
	Св. 0,10 до 0,50 включ.	18	4	6	11	17

3. Метод измерений

Метод основан на экстракции метаболита протиоконазол-дестио из зеленой массы и соломы водным раствором ацетона, из зерна и семян водным раствором ацетонитрила или ацето-

на, из масла ацетонитрилом, очистке экстрактов от коэкстрактивных компонентов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, а также на колонке с оксидом алюминия и концентрирующем патроне, с последующим измерением содержания протиоконазол-дестио в очищенных экстрактах методом капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) при программировании температуры колонки с термоионным детектором (ТИД) и обработкой хроматограмм методом абсолютной градуировки.

4. Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, реактивам и материалам

4.1. Средства измерений

Газовый хроматограф с термоионным детектором	
Весы аналитические с пределом взвешивания до 110 г и допустимой погрешностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—2008
Весы лабораторные с пределом взвешивания до 160 г и допустимой погрешностью 0,005 г	ГОСТ Р 53228—2008
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-1 000-2	ГОСТ 1770—74
Пипетки градуированные 1-1-2-1; 1-1-2-2; 1-2-2-5; 1-2-2-10	ГОСТ 29227—91
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой П-2-5-0,1; П-2-10-0,2	ГОСТ 1770-74
Цилиндры мерные 1-25;1-50; 1-100; 1-500; 1-1000	ГОСТ 1770—74
Микрошприц для ввода образцов для газового хроматографа вместимостью 1—10 $см^3$	ТУ 64-1-2850

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

4.2. Реактивы

Протиоконазол-дестио, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 98,5 %	
Ацетон, особо чистый	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для хроматографии, химически чистый	ТУ 6-09-3534—87
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистиллированная)	ГОСТ Р 52501—2005
Гелий газообразный, очищенный (или азот)	ТУ-0271-135--31323949—2005
н-Гексан, химически чистый	ТУ 6-09-3375—78
Калий марганцово-кислый (калия перманганат), химически чистый	ГОСТ 20490—75
Калий углекислый (калия карбонат), химически чистый	ГОСТ 4221—76
Кальций хлористый (кальция хлорид), химически чистый	ГОСТ 4161-77
Кислота серная концентрированная, химически чистая	ГОСТ 4204—77
Метилен хлористый (дихлорметан), химически чистый	ГОСТ 12794—80
Натрий углекислый, химически чистый	ГОСТ 83—79
Натрий серно-кислый, безводный, химически чистый	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, химически чистый	ГОСТ 4233—77
Фосфор (V) оксид (пентоксид фосфора)	ТУ 6-09-4173—85
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), химически чистый	ГОСТ 1138—84

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией.

4.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания проб	ТУ 64-1-2851—78
Ванна ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Генератор водорода	
Гомогенизатор с металлическим стаканом вместимостью не менее 500 $см^3$ и скоростью вращения ножа не менее 10 000об./мин	
Компрессор	
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные стеклянные	ГОСТ 25336—82
Колба Бунзена вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 50, 100 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колбы плоскодонные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колонка хроматографическая капиллярная кварцевая, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм с нанесенной пленкой из смеси 5 % дифенилполисилоксана и 95 % диметилполисилоксана толщиной 0,5 мкм	
Колонка хроматографическая стеклянная длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм	
Мельница электрическая лабораторная	ТУ 46-22-236—79
Оксид алюминия нейтральный для колоночной хроматографии с размером частиц 0,063—0,200 мм	

Патроны концентрирующие для твердофазной экстракции, 0,6 г гидрофильного нейтрального сорбента с привитыми диольными группами (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающим вакуум до 10 мбар	
Стаканы химические вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Установка для перегонки растворителей с дефлегматором	ГОСТ 9737—93 (ИСО 641—75)
Фильтры бумажные средней плотности	ТУ 6-09-1678—86
Шприц медицинский инъекционный однократного применения вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ Р ИСО 7886-1—09

Примечание. Допускается использование других вспомогательных устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

5. Требования безопасности, охраны окружающей среды

5.1. При работе с реактивами соблюдают требования безопасности, установленные для работы с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.007—76, 12.1.005—88.

5.2. При проведении анализов горючих и вредных веществ соблюдают требования противопожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и должны быть в наличии средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—90. Обучение работающих правилам безопасности труда проводят согласно ГОСТ 12.0.004—90.

5.3. При выполнении измерений с использованием хроматографа соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ Р 12.1.019—2009 и инструкцией по эксплуатации прибора.

5.4. Помещение лаборатории должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03 и 2.2.5.2308—07.

6. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускается специалист, прошедший обучение, имеющий опыт работы в лаборатории и владеющий техникой проведения газохроматографического анализа, освоивший данную методику и подтвердивший соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

7. Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия.

7.1. Условия приготовление растворов и подготовки проб к анализу

Температура воздуха	(20 ± 5) °С
Атмосферное давление	(84—106) кПа
Относительная влажность воздуха	не более 80 %

7.2. Условия хроматографического анализа

Температура термостата испарителя	275 °С
Температура детектора	290 °С
Режим программирования температуры колонки:	
– начальная температура	170 °С
– изотермический режим при 170 °С	2 мин
– скорость подъёма температуры:	
в диапазоне от 170 до 260 °С	25 °С/мин
в диапазоне от 260 до 270 °С	5 °С/мин
– изотермический режим при 270 °С	6 мин
– скорость подъёма температуры:	

в диапазоне от 270 до 280 °С	10 °С/мин
– изотермический режим при 280 °С	8 мин
Расход газов:	
газа-носителя (гелий)	2,0 $см^3$/мин
водорода	4,3 $см^3$/мин
воздуха	175 $см^3$/мин
Деление потока	1 : 20
Объем вводимой пробы	1 $мм^3$
Линейный диапазон детектирования	(0,1—1,0) нг

8. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов, раствора внесения, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, приготовление смесей растворителей, подготовка колонки с оксидом алюминия и концентрирующих патронов, проверка хроматографического поведения протиоконазол-дестио на колонке и патронах.

8.1. Очистка органических растворителей и приготовление растворов

8.1.1. Ацетон

Ацетон перегоняют над перманганатом калия и карбонатом калия (на 1 $дм^3$ ацетона 10 г перманганата калия и 2 г карбоната калия). Срок хранения – 1 неделя.

8.1.2. Ацетонитрил

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора (на 1 $дм^3$ ацетонитрила 20 г пентоксида фосфора) не менее часа, после чего перегоняют. Непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия (на 1 $дм^3$ ацетонитрила – 10 г карбоната калия). Срок хранения – 1 неделя.

8.1.3. н-Гексан

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания последней в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции

промывных вод, перегоняют над карбонатом калия. Срок хранения – 1 неделя.

8.1.4. Хлористый метилен и этилацетат

Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %

Навеску (5,0 ± 0,1) г натрия углекислого растворяют в конической колбе в (40—60) $см^3$ деионизованной воды. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят объем раствора до метки деионизованной водой. Срок хранения раствора – 1 неделя.

Хлористый метилен и этилацетат промывают последовательно раствором натрия углекислого с массовой долей 5 %, насыщенным раствором кальция хлористого, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют. Срок хранения – 1 неделя.

8.1.5. Приготовление ннасыщенного раствора хлорида натрия

В коническую колбу вместимостью 200 $см^3$ вносят навеску (50 ± 2) г натрия хлористого, приливают 100 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают в течение 5 мин, полученный раствор фильтруют. Фильтрат является насыщенным раствором натрия хлористого. Срок годности раствора – 1 неделя.

8.2. Кондиционирование хроматографической колонки

Капиллярную кварцевую колонку устанавливают в термостат хроматографа и, не подсоединяя к детектору, кондиционируют при температуре 290 °С и скорости газа-носителя 2 $см^3$/мин в течение 8—10 ч.

8.3. Приготовление градуировочных растворов

8.3.1. Исходный градуировочный раствор протиоконазол-дестио с массовой концентрация 100 мкг/$см^3$

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают (0,010 ± 0,0001) г протиоконазол-дестио, растворяют в 40—50 $см^3$ этилацетата, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в морозильной камере при температуре не выше (–18) °С в течение 3 месяцев.

8.3.2. Градуировочный раствор протиоконазол-дестио с массовой концентрацией 10 мкг/$см^3$ (раствор № 1)

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 10 $см^3$ исходного раствора протиоконазол-дестио с концентрацией 100 мкг/$см^3$ (п. 8.3.1), разбавляют этилацетатом до метки. Этот

раствор используют для приготовления градуировочных растворов № 2—5.

Для приготовления проб зерна, семян, масла, зеленой массы и соломы с внесением при оценке полноты извлечения протиоконазол-дестио из исследуемых образцов используют ацетоновый раствор протиоконазол-дестио с концентрацией 1 мкг/см^3.

Градуировочный раствор № 1 и ацетоновый раствор протиоконазол-дестио хранят в морозильной камере при температуре не выше минус 18 °С в течение месяца.

8.3.3. Градуировочные растворы протиоконазол-дестио с массовой концентрацией 0,1—1,0 мкг/см^3 (растворы № 2—5)

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см^3 градуировочного раствора № 1 протиоконазол-дестио с массовой концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 8.3.2), доводят до метки смесью гексан-этилацетат с объемным соотношением компонентов 9 : 1, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией протиоконазол-дестио 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см^3 соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

8.4. Градуировка хроматографа

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ) от концентрации протиоконазол-дестио в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной градуировки по 4 градуировочным растворам.

В инжектор хроматографа вводят по 1 мм^3 каждого градуировочного раствора (п. 8.3.3) и анализируют при условиях хроматографирования по п. 7.2. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать предел повторяемости r.

По полученным данным строят градуировочную характеристику.

8.5. Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировки проводят не реже 1 раза в три месяца, а также при смене реактивов или изменении условий анализа.

Для контроля стабильности используют вновь приготовленные градуировочные растворы с массовой концентрацией исследуемого вещества в начале, середине и в конце диапазона

измерений, которые анализируют в точном соответствии с методикой.

Градуировочную характеристику считают стабильной, если для каждого контрольного образца выполняется условие (1)

$$\frac{|S_{изм.} - S_{гр.}|}{S_{гр.}} \cdot 100 \le K_{гр.}, \text{ где} \qquad (1)$$

$S_{изм.}, S_{гр.}$ – значение площади пика протиоконазол-дестио в образце для контроля, измеренное и найденное по градуировочной характеристике соответственно, мкВ;

$K_{гр.}$ – норматив контроля, $K_{гр.} = 0{,}5 \cdot \delta$, где $\pm\delta$ – границы относительной погрешности, % (табл.).

Если условие стабильности не выполняется только для одного образца, то повторно анализируют этот образец для исключения результата, содержащего грубую ошибку.

Если градуировка нестабильна, выясняют причины нестабильности и повторяют контроль стабильности с использованием других образцов для градуировки, предусмотренных методикой. При повторном обнаружении нестабильности градуировки прибор градуируют заново.

8.6. Подготовка колонки с оксидом алюминия и концентрирующего патрона № 1 для очистки экстракта

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г оксида алюминия нейтрального III степени активности в 15 см^3 гексана (оксид алюминия III степени активности по Брокману получают добавлением 6 % воды к навеске оксида алюминия I степени активности). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают 15 см^3 гексана со скоростью 1—2 капли/с, после чего она готова к работе.

Концентрирующий патрон № 1 промывают сначала с помощью медицинского шприца 10 см^3 смеси дихлорметан–ацетон (1 : 1, по объему), а затем 7 см^3 смеси гексан–дихлорметан (7 : 3, по объему) со скоростью 5 см^3/мин.

8.7. Определение объема элюента, необходимого для полного вымывания протиоконазол-дестио из колонки с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,2 см^3 градуировочного раствора протиоконазол-дестио с концентрацией 10 мкг/см^3 в этилацетате (п. 8.3.2). Растворитель упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С, остаток растворяют в 2 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с оксидом алюминия, подготовленную по п. 8.6. Промывают колонку 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли/с, элюат отбрасывают. Затем колонку промывают 40 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), отбирая последовательно по 5 см^3 элюата. Каждую фракцию упаривают досуха, остатки растворяют в 1 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и затем хроматографируют в соответствии с п. 7.2.

По результатам обнаружения протиоконазол-дестио в каждой из фракций определяют объем смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), необходимый для полного вымывания вещества из колонки.

Примечание. Профиль вымывания протиоконазол-дестио может меняться при использовании новых партий сорбента и растворителей.

8.8. Определение объема элюента, необходимого для полного вымывания протиоконазол-дестио из патрона № 1

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,1 см^3 градуировочного раствора протиоконазол-дестио с концентрацией 10 мкг/см^3 в этилацетате (п. 8.3.2). Растворитель упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С, остаток растворяют в 2 см^3 смеси гексан–дихлорметан (7 : 3, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на патрон № 1, подготовленный по п. 8.6. Промывают патрон 6 см^3 смеси гексан–дихлорметан (7 : 3, по объему) со скоростью 1—2 капли/с, элюат отбрасывают. Затем через патрон пропускают 15 см^3 смеси гексан–дихлорметан (4 : 6, по объему), отбирая последовательно по 5 см^3 элюата непосредственно в круглодонные колбы. Растворы в колбах упаривают досуха при температуре не выше 40 °С, остатки растворяют в 1 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), помещая в

ультразвуковую ванну на 1 мин, и затем хроматографируют в соответствии с п. 7.2.

По результатам обнаружения протиоконазол-дестио в каждой из фракций определяют объем смеси гексан–дихлорметан (4 : 6, по объему), необходимый для полного вымывания вещества из патрона.

Примечание. Профиль вымывания протиоконазол-дестио может меняться при использовании новых партий концентрирующих патронов № 1 и растворителей.

9. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ Р 50436—92 «Зерновые. Отбор проб зерна», ГОСТ 13634—90 «Кукуруза. Требования при заготовке и поставке», ГОСТ 28674—90 «Горох. Требования при заготовке и поставке», ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 5791—81 «Масло льняное техническое. Технические условия», «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Пробы зеленой массы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более одного дня; для длительного хранения пробы замораживают и хранят при температуре минус 18 °С до анализа. Пробы зерна, семян и соломы высушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу. Пробы масла хранят в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 0—4 °С. В некоторых случаях масло получают из семян масличных культур экстракцией органическими неполярными растворителями (петролейный и диэтиловый эфиры) непосредственно перед проведением анализа.

10. Проведение определения

10.1. Экстракция протиоконазол-дестио

10.1.1. *Зеленая масса кукурузы и гороха, солома проса.* Образец измельченного растительного материала (зеленая масса 20 г, солома 5 г) помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 см^3, добавляют 100 см^3 смеси ацетон–вода с объемным соотношением

компонентов 8 : 2 и гомогенизируют 3 мин при 10 000 об./мин. Гомогенат фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу вместимостью 250 см^3. Осадок на фильтре промывают 50 см^3 смеси ацетон-вода (8 : 2, по объему). Аликвоту объединенного фильтрата, эквивалентную 5 г зеленой массы или 2 г соломы, переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 и упаривают до водного остатка (5—10 см^3) на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. К водному остатку добавляют 25 см^3 насыщенного раствора хлорида натрия (п. 8.1.5) и проводят очистку экстракта по п. 10.2.

10.1.2. *Зерно кукурузы, семена льна.* Образец размолотых семян массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, добавляют 50 см^3 смеси ацетонитрил–вода с объемным соотношением компонентов 9 : 1 и помещают на аппарат для встряхивания на 40 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 см^3. Осадок на фильтре промывают 25 см^3 смеси ацетонитрил–вода (9 : 1, по объему). Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора и $^1/_2$ его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3. В воронку вносят 10 см^3 гексана, насыщенного ацетонитрилом, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После расслоения фаз гексановый слой отбрасывают, а водно-ацетонитрильную фракцию переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 и упаривают до водного остатка (~1 см^3) на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. К водному остатку добавляют 30 см^3 насыщенного раствора хлорида натрия (п. 8.1.5) и проводят очистку экстракта по п. 10.2.

10.1.3. *Зерно гороха и проса.* Образец размолотых семян массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, добавляют 50 см^3 смеси ацетон–вода с объемным соотношением компонентов 8 : 2 и помещают на аппарат для встряхивания на 40 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 см^3. Осадок на фильтре промывают 25 см^3 смеси ацетон-вода (8 : 2, по объему). Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора и 1/2 его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 и упаривают до водного остатка (~ 3—4 см^3) на ротационном вакуумном испарителе при темпера-

туре не выше 40 °С. К водному остатку добавляют 30 см^3 насыщенного раствора хлорида натрия (п. 8.1.5) и проводят очистку экстракта по п. 10.2.

10.1.4. *Масло.* К образцу масла массой 5 г, помещенного в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, приливают 15 см^3 гексана и перемешивают. К раствору добавляют 30 см^3 ацетонитрила и колбу помещают на встряхиватель на 30 мин. Верхний ацетонитрильный слой декантируют в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 через слой ваты, помещенной в конусную воронку. Операцию экстракции масла повторяют еще дважды, используя 30 и 20 см^3 ацетонитрила. После декантации ацетонитрильного слоя вату промывают 10 см^3 ацетонитрила, которые объединяют с фильтратом. Объединенную ацетонитрильную фазу переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 10 см^3 гексана, насыщенного ацетонитрилом, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После расслоения фаз гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фракцию упаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Далее проводят очистку экстракта по п.п. 10.3 и 10.4.

10.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К водным экстрактам зеленой массы, зерна и семян, полученным по пп. 10.1.1, 10.1.2 и 10.1.3 и находящимся в делительных воронках, приливают 30 см^3 хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения фаз нижний органический слой фильтруют через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Операцию экстракции водной фазы повторяют еще дважды, используя 30 и 20 см^3 хлористого метилена. Объединенную органическую фазу, пропущенную через слой сульфата натрия, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С и остаток подвергают дополнительной очистке на колонке с оксидом алюминия по п. 10.3.

10.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Остаток в круглодонной колбе, полученный по пп. 10.1.4 и 10.2., растворяют в 2 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин.

Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 8.6. Колбу обмывают 2 см^3 смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), которые также наносят на колонку. Промывают колонку 15 см^3 смеси гексан-этилацетат (9 : 1, по объему) со скоростью 1—2 капли/с, элюат отбрасывают. Протиоконазол-дестио элюируют с колонки 25 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему), собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Остаток экстракта зеленой массы растворяют в 2,5 см^3, семян льна в 1,25 см^3, зерна кукурузы, гороха, проса и соломы в 1 см^3 смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 9 : 1, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и растворы анализируют на содержание протиоконазол-дестио по п. 11.1. Экстракт масла дополнительно очищают с помощью концентрирующего патрона № 1.

10.4. Очистка экстракта на концентрирующем патроне № 1

Остаток экстракта кукурузного и льняного масла, полученный по п. 10.3, растворяют с помощью ультразвуковой ванны в 2 см^3 смеси гексан–дихлорметан (7 : 3, по объему) и раствор вносят на подготовленный концентрирующий патрон № 1 (п. 8.6). Патрон промывают 6 см^3 смеси гексан–дихлорметан (7 : 3, по объему) со скоростью 5 см^3/мин, элюат отбрасывают. Протиоконазол-дестио элюируют 10 см^3 смеси гексан–дихлорметан (4:6, по объему) в круглодонную колбу вместимостью 50 см^3 и раствор упаривают досуха на роторном испарителе при температуре не выше 40 °С. Остатки экстрактов кукурузного и льняного масла растворяют соответственно в 1,0 и 1,25 см^3 смеси гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 9 : 1 и растворы анализируют на содержание протиоконазол-дестио по п. 11.1.

Полнота извлечения протиоконазол-дестио при проведении всех операций подготовки пробы не менее 84 %.

11. Выполнение измерений

11.1. В испаритель хроматографа вводят 1 мм^3 очищенного экстракта анализируемой пробы (пп. 10.1—10.4), анализируют при условиях п. 7.2 и регистрируют хроматограмму. Каждый экстракт хроматографируют дважды.

11.2. Для каждого образца зеленой массы, соломы, зерна и семян повторяют операции по пп. 10.1—10.3, 11.1, для образца масла – по пп.10.1, 10.3, 10.4, 11.1.

12. Обработка результатов измерений

12.1. Для обработки результатов хроматографического анализа используют программу сбора и обработки хроматографической информации.

Альтернативная обработка результатов.

По градуировочной характеристике находят значение массовой концентрации протиоконазол-дестио в экстрактах, С, мкг/см^3.

Массовую долю протиоконазол-дестио Х, мг/кг, в образцах зеленой массы, зерне, семенах, масле и соломе рассчитывают по формуле (2).

$$X = \frac{C \cdot V}{0{,}84 \cdot m}, \text{ где} \qquad (2)$$

C – значение массовой концентрации протиоконазол-дестио в экстрактах, мкг/см^3;

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

m – масса анализируемой части образца, соответствующая доле экстракта, использованной для очистки на колонке с оксидом алюминия и патроне № 1 и последующего хроматографического определения, г;

0,84 – коэффициент извлечения протиоконазол-дестио, учитывающий все процедуры подготовки пробы.

При расчете содержания протиоконазол-дестио в эквивалентах протиоконазола полученное значение X умножают на 1,1.

12.2. За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (3)

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений массовой доли протиоконазол-дестио, мг/кг;

r – значение предела повторяемости, % (табл.).

Если условие (3) не выполняется, выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями данной методики.

12.3. Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$\overline{X} \pm 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}, \text{ при } P = 0{,}95, \text{ где}$$

$\overline{X}$ — среднее арифметическое значение результатов n определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

$\pm\delta$ — границы относительной погрешности измерений, % (табл.).

В случае, если полученный результат измерений ниже нижней границы диапазона измерений, результат анализа представляют в виде:

«массовая доля протиоконазол-дестио в зеленой массе и соломе менее 0,05 мг/кг»;

«массовая доля протиоконазол-дестио в зерне кукурузы, гороха, проса и масле кукурузы менее 0,02 мг/кг»;

«массовая доля протиоконазол-дестио в семенах и масле льна менее 0,025 мг/кг».

Экстракты, при хроматографировании которых получают аналитический сигнал протиоконазол-дестио, превышающий аналитический сигнал, получаемый при хроматографировании градуировочного раствора с массовой концентрацией 1,0 мкг/см^3, разбавляют смесью гексан–этилацетат с объемным соотношением компонентов 9 : 1 и анализируют в соответствии с данной методикой.

13. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

13.1. Проверку приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости проводят:

а) при возникновении спорных ситуаций между двумя лабораториями;

б) при проверке совместимости результатов измерений, полученных при сличительных испытаниях (при проведении аккредитации лабораторий и инспекционного контроля).

13.2. Для проведения проверки приемлемости результатов измерений в условиях воспроизводимости каждая лаборатория использует пробы, оставленные на хранение.

13.3. Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости R (4).

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{X_1 + X_2} \leq R, \text{ где} \qquad (4)$$

X_1, X_2 – результаты измерений массовой доли протиоконазол-дестио, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг;

R – значение предела воспроизводимости, % (табл.).

Если предел воспроизводимости не превышен, то приемлемы все результаты измерений и в качестве окончательного результата используют их среднеарифметическое значение. Если предел воспроизводимости превышен, то выполняют процедуры, изложенные в ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (п. 5.3.3).

При разногласиях руководствуются ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (п. 5.3.4).

14. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Контроль качества результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений», используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по п. 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 и показателя правильности по п. 6.2.4 ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

Измерение остаточного содержания протиоконазола по метаболиту протиоконазол-дестио в зерне, масле и зеленой массе кукурузы, семенах и масле льна, зерне и зеленой массе гороха, зерне и соломе проса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1. 3196—14

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 7.05.15

Формат 60x84/16 Усл. печ. л. 1,39

Тираж 150 экз.

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru