Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств тифенсульфурон-метила в семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3101—13

Издание официальное

Москва • 2013

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 тифенсульфурон-метила в семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3101—13

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств тифенсульфуронметила в семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—22 с.

ISBN 978—5—7508—1227—1

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», Минсельхоза России (В. А. Калинин, Е. В. Довгилевич, А. В. Довгилевич, Н. В. Устименко).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 30 мая 2013 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 8 августа 2013 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1227—1

© Роспотребнадзор, 2013
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
8 августа 2013 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств тифенсульфурон-метила в семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3101—13

Свидетельство о метрологической аттестации от 4.10.2012 № 01.00282-2008/0135.04.10.12.

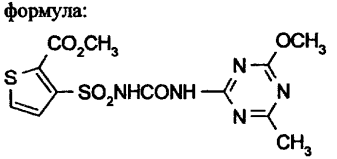
Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств тифенсульфурон-метила в семенах и масле подсолнечника в диапазоне 0,02—0,2 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: тифенсульфурон-метил.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 3-(4-метокси-6-метил-1,3,5-триазин-2-илкарбамоилсульфамоил)тиофен-2-карбоновая кислота.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{12}H_{13}N_5O_6S_2$.

Молекулярная масса: 300,4.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белое кристаллическое вещество без запаха.

Давление паров: $1,7 \times 10^{-5}$ мПа (при 25 °С).

Коэффициент распределения октанол-вода (20 °С): K_{ow} log P = 0,20 (при pH 5), 0,02 (при pH 7).

Температура плавления: 176 °С.

Растворимость в воде, мг/дм^3 (25 °С): 230 при pH 5, 6270 при pH 7.

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, 20 °С): хлористый метилен – 27,5; ацетон – 11,9; ацетонитрил – 7,3; метанол и этилацетат – 2,6; этанол – 0,9; ксилол – 0,2; гексан – менее 0,1.

Тифенсульфурон-метил стабилен при температуре 55 °С. Подвергается гидролизу при температуре 45 °С: DT_{50} составляет 4,7 ч (pH 3), 38 ч (pH 5), 250 ч (pH 7) и 11 ч (pH 9).

Тифенсульфурон-метил кислота с pKa – 4,0 (25 °С).

Краткая токсикологическая характеристика

Тифенсульфурон-метил относится к мало опасным веществам по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс составляет более 5 000 мг/кг) и дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов составляет более 2 000 мг/кг) токсичности, но к умеренно опасным по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 ч) – более 7 900 мг/м^3 воздуха). Не вызывает покраснения кожи, слабо раздражает слизистую оболочку глаз. Не проявляет тератогенных и мутагененных свойств.

Область применения

Тифенсульфурон-метил – гербицид системного действия, проникающий через корни и листья растений и ингибирующий биосинтез изолейцина и валина. Рекомендуется для применения на посевах яровых и озимых зерновых культур (пшеница, ячмень, рожь, овес, тритикале) сои и кукурузы. Хорошо подавляет развитие широколистных сорняков, используется для послевсходовой обработки с нормой расхода 9—60 г д.в./га.

Тифенсульфурон-метил зарегистрирован в России в смеси с Римсульфуроном в качестве гербицида для борьбы с однолетними и многолетними злаковыми и однолетними двудольными сорняками в посевах кукурузы с рекомендуемой нормой расхода по препарату 20—25 г/га.

В России гигиенические нормативы для семян и масла подсолнечника не установлены.

МДУ в импортируемой продукции (мг/кг): семена масличных – 0,05.

1. Погрешность измерений

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 тифенсульфурон-метила

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ± δ, %, $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %	Норматив оперативного контроля точности, K, мг/кг ($P = 0,95$, $m = 2$)
Семена подсолнечника	0,02—0,1 вкл.	50	1,98	5,51	7,71	$0,59 \cdot X^*$
	0,1—0,2 вкл.	25	1,93	5,37	7,51	$0,30 \cdot X^*$
Масло подсолнечника	0,02—0,1 вкл.	50	2,23	6,20	8,68	$0,59 \cdot X^*$
	0,1—0,2 вкл.	25	2,16	6,00	8,41	$0,30 \cdot X^*$

* X – среднее значение массовой концентрации тифенсульфурон-метила в пробе (мг/кг).

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для тифенсульфурон-метила

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, ±, %
Семена подсолнечника	0,02	0,02—0,2	73,96	1,46	± 0,68
Масло подсолнечника	0,02	0,02—0,2	82,06	1,47	± 0,69

2. Метод измерений

Метод основан на определении тифенсульфурон-метила с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из

образцов органическим растворителем, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на концентрирующих патронах № 1 и 2.

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

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Специфичность обеспечивается подбором состава подвижной фазы и выбором колонок различной полярности.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Весы аналитические класса точности – специальный (I), с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения класса точности – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Микрошприц объемом 100 $мм^3$ со шкалой деления 0,001 $см^3$ и погрешностью менее 1 % от номинального объема	
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
pH-метр/милливольтметр с диапазоном измерения 0...14 pH; ± 1 999 мВ	
Хроматографическая система, включающая: – хроматограф жидкостный, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу; – 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

Тифенсульфурон-метил, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,6 %	
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
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Кислота орто-фосфорная, 85 %, чда	ГОСТ 6552—80
Кислота уксусная, ледяная	ГОСТ 61—75
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофильным слабокислым сорбентом с постоянной активностью с размером частиц 63—200 мкм (С) (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции со слабоосновным сорбентом с размером частиц 63—200 мкм с привитыми аминогруппами (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 2)	ТУ 4215-002-05451931—94
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Этилацетат, чда	ГОСТ 22300—76

Примечание. Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами	ГОСТ 25336—82
Аппарат для встряхивания проб с возвратно-поступательным направлением колебаний,	

максимальной загрузкой 10 кг, амплитудой колебаний 30 мм и скоростью от 10 до 300 колебаний в минуту	
Банки полипропиленовые с крышками для экстракции вместимостью 250 $см^3$	
Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 $дм^3$	
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, 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, водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 $дм^3$ и 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 $см^3$ и 4 000 $см^3$ ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18	
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	
Предколонка хроматографическая стальная, длиной 20,0 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8	
Стаканы стеклянные, термостойкие объемом 100—500 $см^3$	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
Фильтры для очистки растворителей диаметром 20 мм, с отверстиями пор 20 мкм	
Центрифуга лабораторная, настольная с максимальным рабочим числом оборотов 4 000 об./мин, рабочим объемом ротора 200 $см^3$ × 4 ячейки, выбираемый временной диапазон работы от 0 до 100 мин и набором полипропиленовых банок емкостью 200 $см^3$	
Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 $см^3$	ГОСТ 22967—90

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

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать нормы, установленные 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—91.

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 определений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов № 1 и 2 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на концентрирующих патронах № 1 и 2, 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. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллированную воду помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к ней 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.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление рабочих растворов

7.2.1.1. *Приготовление 0,1 %-го раствора уксусной кислоты в этилацетате.* В мерную колбу объемом 100 см^3 помещают 50 см^3 этилацетата, прибавляют 0,1 см^3 ледяной уксусной кислоты, перемешивают и доводят этилацетатом объем в колбе до метки.

7.2.1.2. *Приготовление 2 %-го раствора уксусной кислоты в этилацетате.* В мерную колбу объемом 100 см^3 помещают 50 см^3 этилацетата, прибавляют 2,0 см^3 ледяной уксусной кислоты, перемешивают и доводят этилацетатом объем в колбе до метки.

7.2.1.3. *Приготовление 0,1 %-го водного раствора орто-фосфорной кислоты.* В мерную колбу объемом 1 000 см^3 помещают 500 см^3 очищенной воды, прибавляют 1,0 см^3 орто-фосфорной кислоты, перемешивают и доводят водой объем в колбе до метки.

7.2.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанный ацетонитрил и 0,1 %-й водный раствор орто-фосфорной кислоты.

В плоскодонную колбу объемом 1 000 см^3 помещают 300 см^3 ацетонитрила и 600 см^3 0,1 %-й водного раствора орто-фосфорной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см^3/мин в течение 5 мин, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 мин.

7.2.3. Приготовление градуировочных растворов

7.2.3.1. *Стандартный раствор № 1 с концентрацией тифенсульфурон-метила 100,0 мкг/см^3.* Взвешивают 10 мг тифенсульфурон-метила в мерной колбе объемом 100 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 1 хранится в холодильнике не более 1 месяца.

7.2.3.2. *Стандартный раствор № 2 с концентрацией тифенсульфурон-метила 10,0 мкг/см^3.* Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 5 см^3, помещают в мерную колбу объемом 50 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 2 хранится в холодильнике не более 1 месяца.

7.2.3.3. *Стандартный раствор № 3 с концентрацией тифенсульфурон-метила 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 смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 при перемешивании. Стандартный раствор № 3 используется для приготовления стандартного раствора и установления градуировочной характеристики, хранится в холодильнике не более 10 суток.

7.2.3.4. *Стандартный раствор № 4 с концентрацией тифенсульфурон-метила 0,5 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 смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 при перемешивании. Стандартный раствор № 4 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 10 суток.

7.2.3.5. *Стандартный раствор № 5 с концентрацией тифенсульфурон-метила 0,2 мкг/см^3.* Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 50 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 при перемешивании. Стандартный раствор № 5 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 10 суток.

7.2.3.6. *Стандартный раствор № 6 с концентрацией тифенсульфурон-метила 0,1 мкг/см^3.* Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 при перемешивании. Стандартный раствор № 6 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 10 суток.

7.2.3.7. *Стандартные растворы тифенсульфурон-метила с концентрацией 2,0; 1,0; 0,4 и 0,2 мкг/см^3 для внесения в контрольные образцы.* Методом последовательного разведения этилацетатом стандартного раствора № 2 готовят растворы, содержащие по 2,0; 1,0; 0,4 и 0,2 мкг/см^3 и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы.

7.3. Установление градуировочной характеристики

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

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.3. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

7.4. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения тифенсульфурон-метила на нем

7.4.1. Подготовка концентрирующего патрона № 1 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин (1—2 кап./с).

Патрон № 1 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ этилацетата и 5 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения тифенсульфурон-метила на концентрирующем патроне № 1

Из стандартного раствора тифенсульфурон-метила в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/$см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 18 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор обмывают последовательно 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 и 10 $см^3$ 0,1 %-го раствора ледяной уксусной кислоты в этилацетате. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие тифенсульфурон-метил, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюента.

Изучение поведения тифенсульфурон-метила на концентрирующих патронах № 1 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии патронов.

7.5. Подготовка концентрирующего патрона № 2 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения тифенсульфурон-метила на нем

7.5.1. Подготовка концентрирующего патрона № 2 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин (1—2 кап./с).

Патрон № 2 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 10 $см^3$ этилацетата. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения тифенсульфурон-метила на концентрирующем патроне № 2

Из стандартного раствора тифенсульфурон-метила в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/$см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 $см^3$ 0,1 %-го раствора ледяной уксусной кислоты в этилацетате, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор обмывают последовательно 10 $см^3$ 0,1 %-го раствора ледяной уксусной кислоты в этилацетате и двумя порциями по 10 $см^3$ 2 %-го раствора ледяной уксусной кислоты в этилацетате. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие тифенсульфурон-метил, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюента.

Изучение поведения тифенсульфурон-метила на концентрирующих патронах № 2 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии патронов.

7.6. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку с предколонкой устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 30 °С и скорости потока подвижной фазы 1 $см^3$/мин 3—4 ч.

8. Отбор проб и хранение

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», от 21.08.79 № 2051—79, а также в соответствии с ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 22391—89 «Подсолнечник. Требования при заготовках и поставках», ГОСТ Р 52465—05 «Масло подсолнечное. ТУ», ГОСТ Р 52062—03 «Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб».

Отобранные пробы семян подсолнечника подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов.

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

9. Выполнение определения

9.1. Семена подсолнечника

9.1.1. Экстракция

Образец измельченных (размолотых на лабораторной мельнице) семян подсолнечника массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 $см^3$ с 5 г безводного сульфата натрия, прибавляют 50 $см^3$ этилацетата и помещают на 10 мин на аппарат для встряхивания проб. После экстракции пробу центрифугируют 5 мин при скорости 4 000 об./мин. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через фильтр средней плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ этилацетата и помещая на 10 мин на аппарат для встряхивания проб. Пробы центрифугируют,

фильтруют, экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$, упаривают до маслянистого остатка при температуре не выше 30 °С.

9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К остатку в концентраторе, полученному по п. 9.1.1, прибавляют 20 $см^3$ гексана, тщательно обмывая стенки концентратора, фильтруют раствор в сухую делительную воронку через фильтр «красная лента». Концентратор обмывают еще двумя порциями гексана по 20 и 10 $см^3$ и объединяют все смывы в делительной воронке, фильтруя их через фильтр «красная лента». Тифенсульфурон-метил экстрагируют тремя порциями ацетонитрила объемом по 30 $см^3$, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор объемом 250 $см^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 18 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленный патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 5 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 и вносят на патрон, элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ 0,1 %-го раствора ледяной уксусной кислоты в этилацетате, наносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$ и подвергают дальнейшей очистке на концентрирующих патронах № 2.

9.1.4. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2

Элюат, полученный по п. 9.1.3, вносят на подготовленный патрон № 2. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ 0,1 %-го раствора ледяной уксусной кислоты в этилацетате, вносят на патрон, элюат отбрасывают. Тифенсульфурон-метил элюируют 10 $см^3$ 2 %-го раствора ледяной уксусной кислоты в этилацетате. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

9.2. Масло подсолнечника

9.2.1. Экстракция и очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Из пробы подсолнечного масла отбирают в стакан навеску массой 10 г и переносят ее в делительную воронку объемом 250 $см^3$ тремя порциями гексана объемом по 20 $см^3$. Тифенсульфурон-метил экстрагируют тремя порциями ацетонитрила объемом по 30 $см^3$, встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний ацетонитрильный слой сливают в коническую колбу объемом 100 $см^3$. Верхний слой (гексан) отбрасывают.

Ацетонитрильный экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$ и промывают одной порцией гексана объемом 100 $см^3$, встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний ацетонитрильный слой собирают через слой безводного сульфата натрия в концентратор объемом 250 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.1.3 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1» и по п. 9.1.4 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 2».

Сухой остаток растворяют в 2 мл смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

9.3. Условия хроматографирования

Хроматографическая система, включающая:

• хроматограф жидкостный, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу;

• 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 стальная, длиной 250 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая стальная, длиной 20,0 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 %-й водный раствор ортофосфорной кислоты в соотношении 1 : 2.

Длина волны: 230 нм.

Объем вводимой пробы: 20 мм^3.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

10. Обработка результатов

Содержание тифенсульфурон-метила в пробах рассчитывают по формуле:

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

X – содержание тифенсульфурон-метила в пробе, мг/кг;

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

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

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

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

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

P – содержание тифенсульфурон-метила в аналитическом стандарте, %.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предел повторяемости:

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

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

X – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

δ – 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 0,02 мг/кг*».*

* 0,02 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 тифенсульфурон-метила проводят в начале и окончании каждой серии анализов, а также при смене: основных градуировочных растворов № 1 и 2 – каждый месяц, основных градуировочных растворов № 3, 4, 5 и 6 – каждые 10 суток.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание тифенсульфурон-метила в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см^3.

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

$$A = \frac{|X - C| \cdot 100}{C} \leq 1{,}66, \text{ где}$$

X – концентрация тифенсульфурон-метила контрольного измерения, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора тифенсульфурон-метила в смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

1,66 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (A) превышает 1,66 %, 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 тифенсульфурон-метила, 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:

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \bar{X}' - \bar{X} - C_д, \text{ где}$$

$\bar{X}'$, $\bar{X}$, $C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце 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 предел 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

Полнота извлечения тифенсульфурон-метила из семян и масла подсолнечника (5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)

Среда	Внесено тифенсульфурон-метила, мг/кг	Обнаружено тифенсульфурон-метила, мг/кг	Полнота определения, %
Семена подсолнечника	0,02	0,0147± 0,0004	73,5
	0,04	0,0299 ± 0,0003	74,8
	0,10	0,0750 ± 0,0011	75,0
	0,20	0,1451 ± 0,0035	72,5
Масло подсолнечника	0,02	0,0164 ± 0,0005	81,8
	0,04	0,0328 ± 0,0006	82,0
	0,10	0,0813 ± 0,0022	81,3
	0,20	0,1662 ± 0,0018	83,1

Определение остаточных количеств тифенсульфурон-метила в семенах и масле подсолнечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3101—13

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 19.12.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5
Тираж 200 экз. Заказ 92

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