Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств глифосата в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2550—09

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств глифосата в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2550—09

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств глифосата в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—19 с.

1. Разработаны ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (Микитюк О. Д., Назарова Т. А., Макеев А.М.).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 25 июня 2009 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 9 сентября 2009 г.

4. Введены в действие с 1 декабря 2009 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

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

Содержание

1. Метрологическая характеристика метода 5
2. Метод измерений 6
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 6
3.1. Средства измерений 6
3.2. Реактивы 7
3.3. Вспомогательные устройства, материалы 7
4. Требования безопасности 8
5. Требования к квалификации операторов 9
6. Условия измерений 9
7. Подготовка к выполнению измерений 9
7.1. Очистка органических растворителей 9
7.2. Приготовление 0,5 н раствора соляной кислоты 10
7.3. Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия 10
7.4. Приготовление 0,1 н раствора калия фосфорнокислого однозамещенного (pH 4,5) 10
7.5. Приготовление 0,025 М раствора тетраборнокислого натрия (pH 9,0) 10
7.6. Приготовление 0,001 М раствора 9-флуоренилметилхлорформиата 10
7.7. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ 11
7.8. Кондиционирование колонки 11
7.9. Приготовление градуировочных растворов глифосата 11
7.10. Установление градуировочной характеристики 12
7.11. Подготовка анионообменной смолы Дауэкс 1х8 и колонки 12
7.12. Подготовка катионообменной смолы Дауэкс 50W×2 и колонки 12
7.13. Проверка хроматографического поведения глифосата на колонке с Дауэкс 1х8 13
8. Отбор и хранение проб 13
9.Выполнение определения 14
9.1. Экстракция глифосата 14
9.2 Очистка на ионообменных колонках 14
9.3. Дериватизация 15
9.4. Условия хроматографирования 15
10. Обработка результатов анализа 16
11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений 16
Оформление результатов 16
13. Контроль качества результатов измерений 17
14. Разработчики 18

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
9 сентября 2009 г.
Дата введения: 1 декабря 2009 г

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

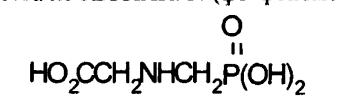
Определение остаточных количеств глифосата в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2550—09

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации глифосата в семенах рапса в диапазоне 0,15—1,5 мг/кг и в масле рапса в диапазоне 0,10—1,0 мг/кг.

Название вещества по ИСО: глифосат.

Название вещества по ИЮПАК: N-(фосфонометил)-глицин.



$C_3H_8PNO_5$.

Молекулярная масса: 169,1.

Белый порошок без запаха. Температура плавления: 189,5 ± 0,5 °С. Давление паров при 25 °С: $1,31 \times 10^{-2}$ мПа. Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log$P$ < - 3,2 (pH 2—5, 20 °С). Хорошо растворим в воде (11,6 г/дм^3) и практически нерастворим в органических растворителях (ацетон, этанол, ксилол).

Вещество стабильно при нормальных условиях хранения, не гидролизуется в водных растворах при pH 3—9.

Краткая токсикологическая характеристика. Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс и мышей составляет соответственно 5 600 и

11 300 мг/кг. Острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс – 5 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс – > 4,98 мг/дм^3 воздуха (4 ч). LC_{50} для рыб > 1 000 мг/дм^3, LC_{50} для дафний – 780 мг/дм^3, LC_{50} для водорослей – 1,2—42 мг/дм^3.

Глифосат малотоксичен для человека, животных, пчёл и птиц, не обладает побочными токсическими эффектами.

В России установлены следующие гигиенические нормативы.

ДСД – 0,01 мг/кг массы тела человека; МДУ в семенах рапса – 0,3 мг/кг, в масле — 0,1 мг/кг.

Область применения препарата. Глифосат – системный гербицид сплошного действия из группы ингибиторов биосинтеза ароматических аминокислот. Применяется для уничтожения злаковых и широколистных сорняков, в том числе с глубокоукореняющейся корневой системой, в посевах сельскохозяйственных культур, в садах и виноградниках, на пастбищах, откосах оросительных и осушительных каналов, промышленных территориях, а также для борьбы с кустарниками в лесных насаждениях. Помимо этого глифосат обладает способностью вызывать десикацию ряда культур, таких как подсолнечник, гречиха, соя и др.

В России глифосат применяется в качестве довсходового или допосевного гербицида на посевах сельскохозяйственных культур, а также для десикации зерновых культур, льна-долгунца, гороха, подсолнечника и сои с нормой расхода до 1,44 кг д.в. на га.

1. Метрологическая характеристика метода

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.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), $\pm\delta$, % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Семена	от 0,15 до 1,0 вкл.	25	3,1	8,7	13,4
Масло	от 0,1 до 1,0 вкл.	25	3,2	9,0	13,9

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

Таблица 2

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Семена	0,15	0,15—1,5	81,2	5,1	± 4,7
Масло	0,10	0,10—1,0	82,0	5,4	± 5,0

2. Метод измерений

Методика основана на определении глифосата с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентным детектором. Контроль глифосата в матрицах осуществляется по содержанию вещества после экстракции его из семян и масла рапса подкисленной водой, очистки экстракта хлороформом и на ионообменных смолах Дауэкс 1 × 8 и Дауэкс 50W×2, дериватизации глифосата с помощью 9-флуоренилметилхлорформиата в щелочной среде.

Количественное определение глифосата проводится методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Избирательность обеспечивается путем подбора колонки, состава подвижной фазы и условий хроматографирования.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Хроматограф жидкостной фирмы Altex, мод. 322 (США) с флуоресцентным детектором	Номер Госреестра
Фирмы Shimadzu, мод. RF-5301 (Япония)	19419-05
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 2104
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 7328
Иономер универсальный ЭВ-74	ГОСТ 22261—76
Колбы мерные вместимостью 100, 1 000 см^3	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328

Пипетки градуированные 2 класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2 класса точности вместимостью 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Глифосат, аналитический стандарт с содержанием д.в.99,8% (Monsanto, США)	
Ацетон, хч	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил, ч	ТУ-6-09-3534—82
Вода дистиллированная, деионизованная	ГОСТ 7602—72
Кислота ортофосфорная, хч	ГОСТ 6552—86
Кислота хлороводородная, хч	ГОСТ 3118—77
Калий фосфорнокислый однозамещенный, хч	ГОСТ 4198—75
Натрия гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
Натрий тетраборнокислый, хч	ГОСТ 4199—76
Хлороформ, хч	ТУ-6-09-4263—76
Эфир диэтиловый, хч	ГОСТ 6262—79
9-флуоренилметилхлорформиат (Sigma – Aldrich, Германия)	
Анионообменная смола Дауэкс 1 × 8 (100—200 меш)/Cl^-– форма/(Serva, Германия)	
Катионообменная смола Дауэкс 50W×2 (100—200 меш)/H^+ – форма/(Serva, Германия)	

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851—78
Вакуумный водоструйный насос	ГОСТ 10696—75
Ванна ультразвуковая, модель D–50, фирма Branson Instr. Co. (США)	
Воронка Бюхнера	ГОСТ 0147
Воронка делительная вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30—37 мм	ГОСТ 25336
Дефлегматор елочный	ГОСТ 9737
Колба Бунзена вместимостью 500 $см^3$	ГОСТ 5614
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 100 $см^3$	ГОСТ 9737

Колбы плоскодонные вместимостью 250 $см^3$	
Колонка хроматографическая, стеклянная (10 × 250 мм)	
Колонка хроматографическая, стальная для ВЭЖХ (4 × 150 мм), заполненная Диасорб 130-NH_2, 7 мкм (ЗАО БиоХимМак СТ, РФ)	ТУ 4215-001-05451931—94
Мельница электрическая лабораторная	ТУ 46-22-236—79
Микрошприц вместимостью 100 $мм^3$ (Hamilton, США)	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Büchi (Швейцария)	ТУ 25-11-917—74
Стаканы химические вместимостью 500 и 2 000 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Установка для перегонки растворителей	
Фильтры бумажные «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги	ТУ 6-09-2678—77
Центрифуга Т-23 (Janetzki, Германия) или аналогичная	

Допускается применение другого оборудования с аналогичными или лучшими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими веществами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостной хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. 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.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя с опытом работы на жидкостном хроматографе.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

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

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка колонок с ионообменными смолами Дауэкс 1 × 8 и Дауэкс 50W×2.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетона. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 000 см^3 ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3).

7.1.2. Очистка ацетонитрила. Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 часа, после чего перегоняют. Непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным.

7.1.3. Очистка хлороформа. Хлороформ встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем растворитель промывают водой, после чего сушат над пентоксидом фосфора и перегоняют.

7.1.4. Очистка диэтилового эфира. Диэтиловый эфир встряхивают со свежеприготовленным раствором железного купороса (30 г сульфата железа, 655 см^3 воды с добавлением 1,5 см^3 концентрированной серной кислоты), затем диэтиловый эфир последовательно промывают 0,5%-ным раствором перманганата калия, 5 %-м раствором гидроксида натрия и водой, после чего сушат над хлористым кальцием и перегоняют.

7.2. Приготовление 0,5 н раствора соляной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, содержащую 200—300 $см^3$ деионизованной воды, вносят 41 $см^3$ концентрированной HCl, перемешивают, доводят объём до метки деионизованной водой и перемешивают.

Растворы соляной кислоты других концентраций готовят из 0,5 *н.* раствора HCl соответствующим разбавлением деионизованной водой.

7.3. Приготовление 1 М раствора гидроксида натрия

40 г NaOH помещают в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, добавляют 500—600 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают до полного растворения вещества, охлаждают раствор до комнатной температуры, доводят объём водой до метки и перемешивают.

7.4. Приготовление 0,1 н раствора калия фосфорнокислого однозамещенного (pH 4,5)

13,56 г KH_2PO_4 помещают в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, добавляют 500—600 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают до полного растворения вещества, доводят объём водой до метки и перемешивают. Кислотность раствора контролируют с помощью иономера. При необходимости доводят pH раствора до 4,5 с помощью 1 М H_3PO_4 или 1 М NaOH.

7.5. Приготовление 0,025 М раствора тетраборнокислого натрия (pH 9,0)

950 мг $Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$ помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 50—60 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают до полного растворения вещества, доводят объём водой до метки и перемешивают. Щёлочность раствора контролируют с помощью иономера. При необходимости доводят pH раствора до 9,0 с помощью 0,5 н. HCl или 1 М NaOH.

7.6. Приготовление 0,001 М раствора 9-флуоренилметилхлорформиата

31,8 мг 9-флуоренилметилхлорформиата помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 50—60 $см^3$ ацетона, перемешивают до полного растворения вещества, доводят объём ацетоном до метки и перемешивают.

7.7. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 350 см^3 ацетонитрила, 650 см^3 0,1 М раствора KH_2PO_4 (п. 7.4), перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.8. Кондиционирование колонки

Промывают колонку для ВЭЖХ 20 см^3 смеси ацетонитрил-вода (1 : 1, по объему), а затем подвижной фазой для ВЭЖХ (п. 7.7) при скорости подачи растворителя 1,0 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.9. Приготовление градуировочных растворов глифосата

7.9.1. Исходный раствор глифосата для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 100 мг глифосата, растворяют в 400—500 см^3 деионизованной воды, доводят объём водой до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранят в холодильнике при температуре 2—4 °С не более одного месяца.

7.9.2. Раствор глифосата № 1 для градуировки (концентрация 10 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора глифосата с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.9.1), доводят водой объём до метки. Этот раствор используют для приготовления рабочих градуировочных растворов №№ 2—5.

Для приготовления проб семян с внесением при оценке полноты извлечения глифосата из исследуемых образцов используют водный раствор глифосата с концентрацией 10 мкг/см^3.

Для приготовления проб масла с внесением при оценке полноты извлечения глифосата из исследуемых образцов используют растворы глифосата в 80 %-м ацетоне с концентрациями 10 и 100 мкг/см^3.

Градуировочный раствор № 1 и растворы для фортификации хранят в холодильнике при температуре 2—4 °С не более одной недели.

7.9.3. Рабочие растворы №№ 2—5 глифосата для градуировки (концентрация 0,01—0,10 мкг/см^3). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 см^3 градуировочного раствора № 1 глифосата с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.9.2), доводят объём деионизованной водой до метки, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2—5 с концентрацией глифосата 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см^3 соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

7.10. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость высоты пика (мм) от концентрации глифосата в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В градуированные пробирки вместимостью 10 см^3 вносят по 1,5 см^3 рабочих стандартных растворов глифосата с концентрациями 0,01; 0,02; 0,05 и 0,10 мкг/см^3 и упаривают их досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяют в 1,5 см^3 0,025 М раствора тетрабората натрия и подвергают дериватизации по п. 9.3.

В инжектор хроматографа вводят по 50 мм^3 полученных растворов флуорогенного производного глифосата и анализируют по п. 9.4. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений и находят среднее значение высоты хроматографического пика для каждой концентрации.

7.11. Подготовка анионообменной смолы Дауэкс 1х8 и колонки

В химический стакан вместимостью 2000 см^{3}помещают 100 г анионообменной смолы Дауэкс 1 × 8 (Cl^-–форма), 1 000 см^3 0,5 н. HCl и перемешивают суспензию в течение 10 мин на магнитной мешалке. После 30-минутного отстаивания декантируют надосадочную жидкость, оставшуюся суспензию смолы фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Смолу на фильтре промывают деионизованной водой до тех пор, пока pH фильтрата не достигнет pH деионизованной воды.

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 10 мм вставляют тампон из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г подготовленного анионита Дауэкс 1 × 8 (Cl^-–форма) в 50 см^3 деионизованной воды. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и вводят в колонку 1 см^3 водного раствора глифосата с концентрацией 10 мкг/см^3. Колонку последовательно промывают 20 см^3 деионизованной воды, 200 см^3 0,5 н. HCl и 250 см^3 деионизованной воды со скоростью 5 см^3/мин, после чего она готова к работе.

7.12. Подготовка катионообменной смолы Дауэкс 50W×2 и колонки

В химический стакан вместимостью 2 000 см^{3}помещают 100 г катионообменной смолы Дауэкс 50W×2 (H^+–форма), 1 000 см^3 0,25 н. HCl и перемешивают суспензию в течение10 мин на магнитной мешалке. После 30-минутного отстаивания декантируют надосадочную жидкость, оставшуюся суспензию смолы фильтруют на воронке Бюхнера через

бумажный фильтр. Смолу на фильтре промывают деионизованной водой до тех пор, пока pH фильтрата не достигнет pH деонизованной воды.

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 10 мм вставляют тампон из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г подготовленного катионита Дауэкс 50W×2 (H^+–форма) в 50 $см^3$ деионизованной воды и дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Затем колонку последовательно промывают 200 $см^3$ 0,25 н. HCl, 200 $см^3$ деионизованной воды и 50 $см^3$ 0,03 н. HCl со скоростью 5 $см^3$/мин, после чего она готова к работе.

7.13. Проверка хроматографического поведения глифосата на колонке с Дауэкс 1х8

В подготовленную по п. 7.11 колонку с Дауэкс 1 × 8 вводят 5 $см^3$ водного раствора глифосата с концентрацией 0,4 мкг/$см^3$, подщелоченного 1 М NaOH до pH 11,0. Колонку промывают 200 $см^3$ деионизованной воды со скоростью 5 $см^3$/мин и элюат отбрасывают. Затем через колонку последовательно пропускают 50 $см^3$ 0,01 н. HCl и 100 $см^3$ 0,03 н. HCl со скоростью 2 $см^3$/мин. Фракционно (по 10 $см^3$) отбирают элюат, упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40 °С и эту операцию повторяют трижды с последовательно вносимыми 5 $см^3$ порциями деионизованной воды для удаления следов кислоты. Остатки растворяют в 1,5 $см^3$ 0,025 М тетрабората натрия, подвергают дериватизации по п. 9.3 и анализируют на содержание глифосата по п. 9.4.

Фракции, содержащие глифосат, объединяют и вновь анализируют по п. 9.4. Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79 г.) и правилами, определенными ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приёмки и методы отбора проб» и ГОСТ 8988—77 «Масло рапсовое, ТУ».

Пробы семян высушивают до стандартной влажности и хранят в сухом проветриваемом помещении. Масло хранят в полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 4—6 °С. В некоторых случаях масло получают из семян рапса экстракцией органическими неполяр-

ными растворителями (петролейный и диэтиловый эфиры) непосредственно перед проведением анализа.

Перед анализом образцы семян размалывают на мельнице.

9.Выполнение определения

9.1. Экстракция глифосата

9.1.1 . Семена. Навеску (10 г) размолотых семян рапса помещают в коническую колбу вместимостью 250 см^3, приливают 125 см^3 0,1 н HCl и перемешивают в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. Суспензию центрифугируют 10 мин при 5 000 g. Надосадочную жидкость декантируют в мерный цилиндр, осадок повторно обрабатывают 50 см^3 0,1н HCl, центрифугируют и полученный экстракт объединяют с первым. Отбирают 1/2 объёма раствора, эквивалентного 5 г образца, и переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3. Добавляют 30 см^3 хлороформа и содержимое энергично встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев хлороформную фракцию отбрасывают. Водную фазу подщелачивают 1 М NaOH до pH 11,0 и центрифугируют 5 мин при 5 000 g. Супернатант декантируют в мерный цилиндр и доводят деионизованной водой до объема 100 см^3. Дальнейшую очистку проводят по п. 9.2.

*9.1.2. Масло.*Навеску (5 г) масла помещают в делительную воронку вместимостью 100 см^3, приливают 50 см^3 0,1 н. HCl и энергично встряхивают в течение 1—2 мин. Нижний водный слой отделяют, а масло повторно обрабатывают 30 см^3 0,1 н HCl. Объединённые водные экстракты переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 50 см^3 хлороформа и энергично встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев нижнюю хлороформную фракцию отбрасывают, а водную фазу подщелачивают 1 М NaOH до pH 11,0 и центрифугируют 5 мин при 5 000 g. Супернатант декантируют в мерный цилиндр и доводят деионизованной водой до объема 100 см^3. Дальнейшую очистку проводят по п. 9.2.

9.2 Очистка на ионообменных колонках

Аликвоты экстрактов семян и масла объёмом 12 см^3(из пп. 9.1.1 и 9.1.2) пропускают через колонку с Дауэкс 1×8 (п. 7.11) со скоростью 2 см^3/мин. Колонку последовательно промывают 200 см^3 воды и 50 см^3 0,01 н. HCl со скоростью 5 см^3/мин, которые отбрасывают. Глифосат элюируют 60 см^3 0,03 н. HCl со скоростью 2 см^3/мин. Полученный элюат пропускают через колонку с Дауэкс 50W×2 (п. 7.12) со скоростью 2 см^3/мин. Отбрасывают первые 5 см^3 элюата и собирают в грушевид-

ную колбу остальной элюат. Колонку промывают 10 см^3 0,03 н. HCl и элюат объединяют с ранее полученным. Объединенный элюат упаривают досуха на роторном испарителе при температуре 40 ^{o0}C, и эту операцию повторяют трижды с последовательно вносимыми 5 см^3 порциями деионизованной воды для удаления следов кислоты. Сухой остаток экстракта рапсового масла растворяют в 6 см^3, а семян в 9 см^3 0,025 М раствора тетрабората натрия. Отбирают аликвоту раствора объёмом 1,5 см^3, переносят в градуированную пробирку с пришлифованной пробкой вместимостью 10 см^3 и подвергают дериватизации по п. 9.3.

9.3. Дериватизация

К 1,5 см^3 приготовленного для дериватизации раствора глифосата (п. 7.10) или образца (п. 9.2) прибавляют 1,5 см^3 0,001 М ацетонового раствора 9-флуоренилметилхлорформиата (п. 7.6) и содержимое хорошо перемешивают. Реакционную смесь выдерживают 20 мин при комнатной температуре, а затем трижды обрабатывают 2 см^3 порциями диэтилового эфира для удаления избытка флуорогенного реактива. К водному остатку добавляют деионизованной воды до объема 2,5 см^3. 0,5 см^3 водного раствора переносят в мерную пробирку вместимостью 5 см^3, прибавляют 4,5 см^3 подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 7.7), перемешивают и анализируют на содержание глифосата по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Жидкостной хроматограф фирмы Altex, мод.322 (США) с флуоресцентным детектором фирмы Shimadzu, мод.RF-5301 (Япония).

Хроматографическая колонка стальная, 4 × 150 мм, заполненная Диасорб-130-Амин (7 мкм).

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 М раствор KH_2PO_4, pH 4,5 (35 : 65, по объему).

Скорость потока элюента: 1,0 см^3/мин.

Температура колонки: комнатная.

Длина волны: λ_{max} возбуждения 270 нм; λ_{max} эмиссии 313 нм.

Чувствительность детектора: 4.

Объем вводимой пробы: 50 мм^3.

Время удерживания глифосата: около 9 мин.

Линейный диапазон детектирования: 0,03—1,5 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят 3 раза и вычисляют среднюю высоту пика.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,1 мкг/см^3, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

10. Обработка результатов анализа

Содержание глифосата рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{H_1 \times A \times V}{H_0 \times m}, \text{ где}$$

X – содержание глифосата, мг/кг;
H_1 – высота пика образца, мм;
H_o – высота пика стандарта, мм;
A – концентрация стандартного раствора глифосата, мкг/см^3;
V – объём экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;
m – масса анализируемой части образца, г (для семян и масла – 0,6 г).

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;
r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8\sigma_r$.

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

Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ- граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 нижней границы определения»

< 0,15 мг/кг для семян рапса.*

*< 0,10** мг/кг для масла рапса.*

**0,15 мг/кг – предел обнаружения для семян рапса.*

***0,10 мг/кг – предел обнаружения для масла рапса.*

13. Контроль качества результатов измерений

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

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

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

$\pm\Delta_{л,\bar{X}}\left(\pm\Delta_{л,\bar{X}'}\right)$ – 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;

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

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

Норматив контроля K рассчитывают по формуле

$$K = \sqrt{\Delta^2_{\pi,\bar{X}'} + \Delta^2_{\pi,\bar{X}}} .$$

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_k| \le K \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.

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

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

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

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

14. Разработчики

Микитюк О. Д., ст. науч. сотр., канд. биол. наук; Назарова Т. А., науч. сотр., канд. биол. наук; Макеев А.М., зав. лаб., канд. биол. наук.

ВНИИ фитопатологии, 143050, Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел. 692-92-20.

Приложение

Таблица

Полнота определения глифосата в модельных матрицах ($n = 5$)

Матрица	Внесено, мг/кг	Открыто, %	Доверительный интервал среднего, %
Семена	0,15	76,2	±3,5
	0,30	78,8	±3,5
	0,75	83,9	±3,3
	1,50	85,8	±3,2
Масло	0,10	76,2	±3,6
	0,20	80,7	±3,6
	0,50	83,4	±3,2
	1,00	87,5	±2,7

Определение остаточных количеств глифосата в семенах и масле рапса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2550—09

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 18.12.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 200 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 952-50-89

gost.e-ecolog.ru