Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2549—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 тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2549—09

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле методом газожидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—14 с.

1. Разработаны ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (авторы Долженко В. И., Цибульская И. А., Блинова Т. Ф.).

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. Вводная часть 4
2. Методика определения тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле методом газожидкостной хроматографии 5
2.1. Основные положения 5
2.2. Реактивы и материалы 6
2.3. Приборы и посуда 7
2.4. Отбор и хранение проб 8
2.5. Подготовка к определению 8
2.6. Проведение определения 9
3. Проверка приемлемости результатов параллельных определений 11
4. Оформление результатов 11
5. Контроль качества результатов измерений 12
6. Требования техники безопасности 14
7. Требования к квалификации оператора 14
8. Разработчики 14

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

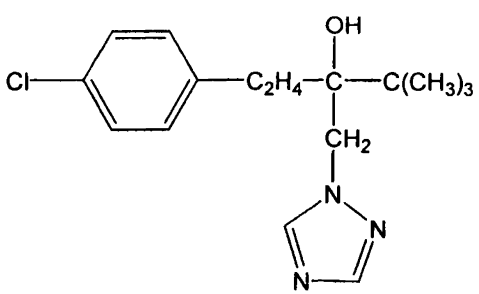
Определение остаточных количеств тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле методом газожидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2549—09

Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения в зерне сои, соевом и кукурузном масле массовой концентрации тебуконазола в диапазоне концентраций 0,05—1,0 мг/кг.

1. Вводная часть

Тебуконазол (ISO).
Структурная формула:



(RS)-1р-хлорфенил-4,4-диметил-3-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил метил)пентан-3-ил (IUPAC).

Брутто формула: $C_{16}H_{22}ClN_3O$.

Мол. масса: 307,8.

Химически чистый препарат - бесцветное кристаллическое вещество.

Температура плавления: 105 °С.

Давление паров при 20 °С - $1,7 \times 10^{-3}$ mPa.

Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} log $P = 3,7$ (20 °С).

Растворимость в воде при 20 °С – 36 мг/дм^3 (pH 5—9); гексане < 0,1; изопропаноле, толуоле – 5—100, дихлорметане > 200 (в г/дм^3 при 20 °С).

Вещество стабильно на свету, при повышенной температуре и гидролизу в чистой воде.

Класс токсичности по ВОЗ – III, ЕПА – II.

Острая оральная токсичность (LD_{50}) для крыс 4 000 мг/кг, дермальная > 5 000 мг/кг.

Гигиенические нормативы для рапса: МДУ в кукурузе (зерно) – 0,1 мг/кг, в сое (зерно, масло) – 0,1 мг/кг.

Область применения: системный фунгицид широкого спектра действия для борьбы с болезнями листьев и колосьев зерновых (фузариоз, септориоз, ржавчина, мучнистая роса и др.), серой гнилью виноградной лозы, некоторыми заболеваниями сои, рапса, подсолнечника. Используется как протравитель семян на зерновых.

2. Методика определения тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле методом газожидкостной хроматографии

2.1. Основные положения

2.1.1. Область применения и принцип метода. Настоящий документ устанавливает методику определения остаточных количеств тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле в диапазоне концентраций 0,05—1,0 мг/кг.

Методика основана на извлечении тебуконазола из зерна сои и растительного масла водно-ацетоновым раствором или ацетонитрилом с последующей очисткой перераспределением между двумя несмешивающимися жидкостями и на колонке с флорисилом. Количественное определение проводят методом газожидкостной хроматографии с использованием термоионного детектора.

2.1.2. Избирательность метода. Избирательность метода обеспечивается очисткой экстрактов анализируемых проб и сочетанием условий хроматографирования.

2.1.3. Метрологическая характеристика метода. Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Метрологические параметры

Объект анализа	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, %
Зерно сои	0,05—0,1	50	4,7	13,2	14,5
	0,1—1,0	25	4,2	11,8	12,9
Масло соевое	0,05—0,1	50	4,8	13,4	14,8
	0,1—1,0	25	4,6	12,9	15,5
Масло кукурузное	0,05—0,1	50	4,7	13,2	14,5
	0,1—1,0	25	4,1	11,5	12,6

Таблица 2

Полнота определения тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле (N=5 для каждой концентрации)

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата,±, %
Зерно сои	0,05	0,05—1,0	80,4	4,7	4,3
Масло сои	0,05	0,05—1,0	77,8	4,6	4,2
Масло кукурузы	0,05	0,05—1,0	78,4	4,2	3,8

2.2. Реактивы и материалы

Аналитический стандарт тебуконазола 99,6 %
Ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил, х.ч. ТУ 6-09-3534—87
Азот газообразный в баллонах с редуктором ТУ-6-16-40-14—88
Бумажные фильтры «красная лента» ТУ 6.091678—86
Вода дистиллированная ГОСТ 6709—79

Гексан, х.ч.	ТУ 2631-003-05807999—98
Дихлорметан х.ч.	ТУ 2631-019-44493179—98
Калий углекислый, х.ч.	ГОСТ 4221—76
Кальция хлорид, х.ч.	ГОСТ 4161—77
Насадка для колонки: хроматон N-Super (0,125—0,160 мм) с 5 % SE-30 (Чехия)	
Натрий сернокислый безводный, ч., свежепрокаленный	ГОСТ 4166—76
Натрия хлорид, х.ч.	ГОСТ 4233—77
Стекловата	
Флорисил 150—250 μm (Merck, Германия), содержание воды ≤ 2,5 %	
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.д.а.	ГОСТ 22300—76
Элюент для колоночной хроматографии № 1: гексан–этилацетат (50 : 50 по объему)	
Элюент для колоночной хроматографии № 2: гексан–этилацетат (70 : 30 по объему)	
Элюент для колоночной хроматографии № 3: гексан–этилацетат (30 : 70 по объему)	

2.3. Приборы и посуда.

Газовый хроматограф Цвет-550 М с термоионным детектором и стеклянной насадочной колонкой, длиной 1 м; внутренним диаметром 3 мм, или аналогичный по своим техническим характеристикам	
Весы аналитические ВЛА-200 или аналогичные	ГОСТ 24104—2001
Весы технические ВЛКТ-500	ГОСТ 24104—80
Мельница лабораторная зерновая ЛМЗ	ТУ 1-01-0593—79
Установка ультразвуковая «Серьга»	ТУ 3.836.008
Ротационный вакуумный испаритель Büchi R-200/205 (Швейцария) или аналогичный	
Микрошприц МШ-10, МШ- 10М	ТУ 2-833-106
Насос водоструйный	МРТУ 42 861—64
Колбы плоскодонные на шлифах КШ500 29/32 ТС	ГОСТ 25 336-82Е
Колбы круглодонные на шлифах КШ50 29-32 ТС	ГОСТ 25 336-82Е
Воронки лабораторные В-75-110	ГОСТ 25 336-82Е
Воронки делительные ВД-3-500	ГОСТ 8613—75

Цилиндры мерные на 100 $см^3$	ГОСТ 1774-74Е
Колбы мерные на 25, 50, 100 $см^3$	ГОСТ 1770-74Е
Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Стаканы химические	ГОСТ 25336-82Е
Колонка стеклянная хроматографическая длиной 25 см, диаметром 10 мм	

2.4. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ 10852—86. «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб».

Для длительного хранения зерно сои подсушивают при комнатной температуре в отсутствие света. Сухие образцы могут храниться в течение года. Перед анализом пробы зерна доводят до стандартной влажности и измельчают. Пробы масла хранят в холодильнике при 0—4 °С в закрытой стеклянной таре не более 2 мес.

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей. Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном вакуумном испарителе при температуре + 40 °С до объема 1,0 $см^3$ и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками.

2.5.2. Кондиционирование колонки. Перед началом анализа колонку, заполненную хроматоном N-Super (0,125—0,160 мм) с 5 % SE-30, не присоединяя к детектору, кондиционируют в токе инертного газа (азот) при температуре 250 °С до получения стабильной нулевой линии.

2.5.3. Приготовление стандартного и градуировочных растворов. Берут точную навеску тебуконазола (50 мг), переносят в мерную колбу на 50 $см^3$, растворяют навеску в ацетоне и доводят до метки (Стандартный раствор с концентрацией 1,0 мг/$см^3$). Градуировочные растворы с концентрациями 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 и 10 мкг/$см^3$ готовят методом последовательного разбавления по объему, используя для разбавления гексан. Стандартный раствор можно хранить в холодильнике при температуре 0—4°°С в течение 6 мес., градуировочные растворы – в течение недели.

Для внесения в образец при определении полноты извлечения используют градуировочные растворы.

2.5.4. Построение градуировочного графика. Для построения градуировочного графика (высота или площадь пика – концентрация тебуконазола в растворе) в хроматограф вводят по 1 $мм^3$ градуировочных

растворов (не менее 3 параллельных измерений для каждой концентрации, не менее 4 точек по диапазону измеряемых концентраций), измеряют высоты или площади пиков и строят график зависимости среднего значения высоты (площади) пика от концентрации тебуконазола в градуировочном растворе (мкг/см^3).

2.5.5. Подготовка колонки с флорисилом для очистки экстракта. В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 1 см помещают тампон из стекловаты и вносят суспензию 4 г флорисила в 20 см^3 смеси гексан:этилацетат (1 : 1, по объему), дают растворителю стечь до верхнего края сорбента. Колонку промывают 20 мл этой же смеси со скоростью 1—2 кап./сек, после чего она готова к работе.

2.5.6. Проверка хроматографического поведения тебуконазола на колонке с флорисилом. В круглодонную колбу емкостью 10 см^{3}отбирают 1 см^3 стандартного раствора тебуконазола с концентрацией 2 мкг/см^3. Отдувают растворитель током теплого воздуха, остаток растворяют в 2 см^3 элюента № 1 и вносят в колонку. Колбу обмывают еще 2 см^3 элюента № 1 и также вносят в колонку. Затем последовательно промывают колонку 20 см^3 гексана и 10 см^3 элюента № 2. Далее элюируют тебуконазол 40 см^3 элюента № 3 со скоростью 1—2 кап./сек. Отбирают фракции по 10 см^3 каждая, упаривают досуха, остаток растворяют в 1 см^3 гексана и анализируют на содержание тебуконазола по п. 2.6.4. Фракции, содержащие тебуконазол, объединяют, упаривают досуха, остаток растворяют в 1 см^3 гексана и анализируют по п. 2.6.4. Рассчитывают содержание тебуконазола в элюате, определяя полноту вымывания вещества из колонки и необходимый для этого объем элюента.

Примечание: профиль вымывания тебуконазола может меняться при использовании новой партии сорбента.

2.5.7. Подготовка приборов и средств измерения. Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями технической документации.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Экстракция тебуконазола из зерна сои. Навеску измельченного на лабораторной мельнице зерна сои, массой 10 г помещают в коническую колбу на 250 см^3, заливают 50—100 см^3 смеси растворителей ацетон – вода (в соотношении 1 : 1) и экстрагируют тебуконазол в ультразвуковой ванне в течение 10 мин. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр («красная лента»). Экстракцию повторяют дважды порциями по 30 см^3 той же смеси. Объединенный фильтрат помещают в делительную воронку и переэкстрагируют тебуконазол дихлорметаном три-

жды порциями по 30 см^3. Для ускорения расслоения можно добавить небольшое количество (5 см^3) насыщенного раствора хлорида натрия. Объединенные дихлорметановые экстракты фильтруют через слой безводного сернокислого натрия. Полученный раствор выпаривают на ротационном испарителе при температуре бани 50 °С до полного удаления дихлорметана. Далее проводят очистку экстрактов по п. 2.6.3.

2.6.2. Экстракция тебуконазола из соевого и кукурузного масла. Навеску масла 10 г растворяют в 50 см^3 гексана и экстрагируют тебуконазол 50 см^3 ацетонитрила в УЗ-ванне в течение 15 мин. Полученную смесь помещают в делительную воронку объемом 250 см^3. После расслоения* нижний ацетонитрильный слой сливают, из верхнего гексанового слоя экстрагируют тебуконазол ацетонитрилом еще дважды порциями по 25 см^3. К объединенному ацетонитрильному экстракту добавляют воду в соотношении ацетонитрил : вода = 1 : 4 и переэкстрагируют тебуконазол дихлорметаном трижды порциями по 30 см^3. Объединенные дихлорметановые экстракты сушат над безводным сернокислым натрием и выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре 50 °С. Сухой остаток растворяют в 5 см^3 ацетона и помещают в морозильную камеру с температурой – 18 °С на 2 ч. Охлажденный ацетоновый раствор декантируют в круглодонную колбу на 10 см^3 через фильтр «красная лента», после чего фильтр промывают 2 см^3 охлажденного ацетона. Полученный раствор упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°°С до полного удаления ацетона. Далее очистку проводят по п. 2.6.3.

*В случае образования сравнительно стойких эмульсий можно добавить несколько мл насыщенного раствора хлорида натрия.

2.6.3. Очистка экстрактов на колонке с флорисилом. Остаток в колбе, полученный при упаривании очищенных по п.п. 2.6.1 и 2.6.2 экстрактов зерна сои или масла, количественно переносят двумя порциями по 2 см^3 смеси гексан–этилацетат (1 : 1, по объему) в кондиционированную хроматографическую колонку (п. 2.5.5). Промывают колонку 20 см^3 гексана, которые отбрасывают, затем 10 см^3 элюента № 2, которые тоже отбрасывают. Тебуконазол элюируют 40 см^3 элюента № 3 (гексан–этилацетат = 3 : 7). Весь элюат собирают в грушевидную колбу емкостью 100 см^3. Раствор выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 50°°С. Сухой остаток растворяют в 1—2 см^3 гексана и 1 мм^3 раствора вводят в хроматограф.

2.6.4. Условия хроматографирования. Газовый хроматограф «Цвет-550М» с ТИД или аналогичный.

Колонка стеклянная 1 м × 3 мм, заполненная хроматоном N-Super (0,125—0,160 мм) с 5 % SE-30. Температура колонки 235 °С, испарителя – 250 °С, детектора – 390 °С.

Скорость газа-носителя (азот) через колонку 32,2 $см^3$/мин, водорода – 16,9 $см^3$/мин, воздуха – 200 $см^3$/мин. Объем вводимой пробы 1—2 мкл.

Линейный диапазон детектирования 0,5—10 нг.

2.6.6. Обработка результатов анализа. Количественное определение проводят методом абсолютной градуировки, содержание тебуконазола в образце зерна сои или масла (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{H_2 \times C \times V}{H_1 \times P}, \text{ где}$$

H_1 – высота (площадь) пика тебуконазола в стандартном растворе, мм (мв·сек);

H_2 – высота (площадь) пика тебуконазола в анализируемой пробе, мм (мв·сек);

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

P – навеска анализируемого образца, г;

C – концентрация тебуконазола в стандартном растворе, мкг/$см^3$.

Содержание остаточных количеств тебуконазола в анализируемом образце вычисляют как среднее из 2 параллельных определений.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор тебуконазола 10 мкг/мл разбавляют.

3. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

r – значение предела повторяемости ($r = 2{,}8\sigma_r$).

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

4. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

$\overline{X}$ – 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), %.

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

«содержание вещества в пробе «менее нижней границы определения» (например: менее 0,01 мг/кг, где *- 0,05 мг/кг – предел обнаружения в растительном масле).*

5. Контроль качества результатов измерений

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

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

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

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

$$K_k = X' - X - C_д, \text{ где}$$

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

Норматив контроля K рассчитывают по формуле

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

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.

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

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

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

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

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

6. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1005—88).

При выполнении измерений с использованием газового хроматографа и работе с электроустановками соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019—79 и инструкциями по эксплуатации приборов.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004—91.

7. Требования к квалификации оператора

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист-химик, имеющий опыт работы методом газожидкостной хроматографии, ознакомленный с руководством по эксплуатации хроматографа, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 5.

8. Разработчики

Долженко В. И., Цибульская И. А., Блинова Т. Ф.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (Санкт-Петербург, г. Пушкин).

Определение остаточных количеств тебуконазола в зерне сои, соевом и кукурузном масле методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2549—09

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 18.12.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,0

Тираж 200 экз.

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, 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