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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств фолпета в виноградном соке методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2454—09

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств фолпета в виноградном соке методом газожидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—15 с.

1.Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов», Минсельхоза России (В. А. Калинин, профессор, канд. с-х. наук, Е. В Довгилевич, ст. науч. сотр., канд. биол. наук, А. В. Довгилевич, ст. науч. сотр., канд. хим. наук, М. В Разумихин, науч. сотр., Е. Н. Щербинкина ., инженер).

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 декабря 2008 г. № 3).

3.Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 2 февраля 2009 г.

4. Введены в действие с 29 апреля 2009 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

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

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
2 февраля 2009 г.
Дата введения: 29 апреля 2009 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств фолпета в виноградном соке методом газожидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2454—09

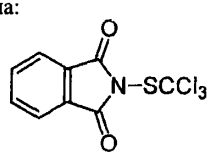
Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств фолпета в виноградном соке в диапазоне 0,02—0,1 мг/кг.

Краткая характеристика препарата.

Название действующего вещества по ИСО: Фолпет.

Название действующего вещества по ИЮПАК: N-трихлорметилтиофталимид.

Структурная формула:



$C_9H_4Cl_3NO_2S$
Мол. масса: 296,6

Агрегатное состояние: кристаллическое вещество.

Цвет, запах: белое вещество, почти без запаха.

Температура плавления: 177 °С.

Летучесть (давление паров): $2,1 \times 10^{-2}$ мПа (при 25 °С).

Растворимость: в воде 0,8 мг/дм^3 при комнатной температуре; в органических растворителях при 25 °С (г/дм^3): толуоле – 26; метаноле – 3. Коэффициент перераспределения в системе октанол : вода: $K_{ow}\log P$ – 3,11.

Стабильность в водных растворах: быстро разрушается в щелочной среде. DT_{50} – 1,1 ч (pH 7), в водных кислых растворах разрушается с DT_{50} 10,5 ч при pH – 3,0.

Отличается высокой реакционной способностью, быстро разрушается в биологических средах и почве.

Краткая токсикологическая характеристика

Фолпет относится к малоопасным веществам по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс > 9 000 мг/кг), дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов > 4 500 мг/кг), но к опасным по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс – 1 890 мг/м^3 при 4–часовой экспозиции). Может вызывать раздражение кожи с сенсибилизацией и слизистых оболочек глаз, проявляет канцерогенный эффект в опытах на животных.

В России для фолпета установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,01 мг/кг массы тела человека; МДУ в продукции (мг/кг): содержание вещества в картофеле, винограде, плодовых ягодных, томатах не допускается (на уровне чувствительности метода контроля).

Область применения

Фолпет – контактный фунгицид с неспецифическим местом действия и коротким защитным действием. Высокоэффективен в борьбе с болезнями растений, вызываемыми ложномучнисторосяными и мучнисторосяными грибами, в плодовых садах, на виноградниках, в посевах овощных культур и плантациях картофеля.

Применяется в России на виноградниках против милдью и плантациях картофеля против фитофтороза и макроспориоза с нормой расхода 1,25—1,5 кг д.в./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.

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

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, %
Виноградный сок	0,02—0,1	50	9	25	29

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определямых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Виноградный сок	0,02	0,02—0,10	85	5,7	2,2

2. Метод измерений

Метод основан на определении фолпета методом газожидкостной хроматографии с использованием детектора постоянной скорости рекомбинации электронов после экстракции данных веществ из исследуемой пробы ацетонитрилом и очистки экстракта путем перераспределения в несмешивающихся жидкостях и с помощью колоночной хроматографии на флоризиле.

Идентификацию веществ проводят по времени удерживания путем сравнения с аналитическим стандартом, а количественное определение – методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Избирательность обеспечивается путем подбора колонки и изменения температуры колонки.

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

3.1. Средства измерений

Весы аналитические Σ 11140 с пределом
допустимой погрешности ± 0,0001 г,
фирма «OHAUS»

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г V600, «ACCULAB»	
Колбы мерные вместимостью 10, 50 и 100 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Микрошприц Гамильтон, вместимостью 10 $мм^3$	
Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$	ГОСТ 20292—74
Хроматограф газовый «Кристалл 2 000м» с термоионным детектором (ТИД) с пределом детектирования по азоту в азобензоле 5×10^{-13} $г/см^3$ и приспособлениями для капиллярной колонки	
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Аналитический стандарт фолпета, содержание основного вещества 99,5 % фирмы Мактешим Аган Индастриз Лтд.	
Азот особой чистоты	ГОСТ 9293
Ацетонитрил, хч	ТУ 6-09-06-1092—83
Вода дистиллированная	ГОСТ 7602—72
Гексан ч	ТУ 6-09-3375
Натрий хлористый чда, водный раствор массовой концентрации 40 $г/дм^3$	ГОСТ 4233
Флоризил для колоночной хроматографии с размером частиц 60—80 меш, фирма «Агрос Органикс», Бельгия, код 205450010	
Хлористый метилен, хч	ГОСТ 19433—88

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Аппарат для встряхивания проб TYP LT1 фирмы «SKLO UNION»	
Банки с крышками для экстракции на 250 $см^3$, полипропилен, кат.№3120-0250, NALGENE	
Воронки химические для фильтрования, стеклянные	ГОСТ 8613—75

Воронки делительные на 250 см^3	ГОСТ 10054—75
Испаритель ротационный вакуумный ИР-1М	ТУ 25-11-917
Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi с водяной баней B-480	
Концентраторы грушевидные на 100 и 250 см^3, НШ 29 КГУ – 100 (250)	ГОСТ 10394—72
Колонка хроматографическая, капиллярная кварцевая HP-5 длина 15 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,25 мкм, фирма J&W Scientific	
Насос вакуумный диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laboport	
Фильтры бумажные «красная лента»	ТУ 6-09-2678—77

Допускается применение хроматографических колонок и другого 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, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на газовый 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 определений

7.1. Подготовка растворителей

Все растворители используют свежеперегнанными. Перегонку растворителей проводят, строго отбирая фракцию, соответствующую по температуре кипения основному веществу.

7.2. Приготовление стандартных и градуировочных растворов фолпета

Основной раствор фолпета готовят, количественно перенося навеску вещества массой по 100 мг в мерные колбы вместимостью 100 см^3. В колбы вносят 20 см^3 ацетона, содержимое колб перемешивают до полного растворения кристаллов фолпета. Объем раствора в колбах доводят до метки ацетоном, после чего содержимое колб тщательно перемешивают. Получают раствор фолпета массовой концентрации 1 мг/см^3 (раствор № 1), который может храниться не более 1 месяца.

Методом последовательного разбавления раствора № 1 ацетоном в мерных колбах готовят рабочие растворы с концентрациями фолпета 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см^3, которые могут храниться в холодильнике не более 10 суток.

Основной и градуировочные растворы фолпета хранят в холодильнике.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации фолпета в растворе устанавливают методом абсолютной калибровки по стандартным растворам с концентрациями 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см^3.

Для построения градуировочного графика в инжектор хроматографа вводят по 1 мм^3 каждого градуировочного раствора фолпета и хроматографируют в условиях п. 9.2. Проводят не менее 3 параллельных из-

мерений и находят среднее значение площади хроматографического пика для каждой концентрации. По полученным данным строят градуировочный график зависимости площади хроматографического пика в мВ от концентрации фолпета в растворе в мкг/см^3

7.4. Подготовка колонки для очистки экстракта

В пластмассовую колонку длиной 15 см, диаметром 1,5 см помещают на дно чистую стекловату и заполняют колонку 5 г флоризила 60/100 меш, уплотняя его путем вибрации колонки. На слой флоризила наносят слой безводного сернокислого натрия толщиной 1 см. Флоризил в колонке промывают 15 мл ацетона, ацетон под давлением удаляют из колонки. Затем колонку промывают 15 мл гексана.

7.5. Проверка хроматографического поведения фолпета на колонке для очистки экстракта

Хроматографическое поведение фолпета проверяют каждый раз при использовании новой партии флоризила. В стаканчик помещают 1 мл стандартного раствора фолпета с концентрацией 0,1 мкг/мл, добавляют 9 мл гексана, перемешивают содержимое и наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 10 мл гексана и 5 мл смеси гексан:ацетон – 4 : 1, смывы отбрасывают.

Пропускают через колонку 4 порции смеси гексан–ацетон (1 : 1) по 5 мл каждая, собирая их в отдельные концентраторы. Собранные фракции выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 1 мл ацетона и вводят в хроматограф 1 мкл пробы. Фракции, содержащие фолпет, объединяют, выпаривают досуха, сухой остаток вновь растворяют в 1 мл ацетона и вводят в хроматограф 1 мкл пробы. Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смыва с колонки и необходимый для очистки объем элюата.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», № 2051—79 от 21.08.79 г., а также с ГОСТ 25892—83 – «Виноградный сок, ТУ».

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

9. Выполнение определения

9.1. Виноградный сок

9.1.1. *Экстракция фолпета из анализируемой пробы и предварительная очистка.* Навеску сока 10 г разводят 10 мл насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку. Добавляют в воронку 50 мл ацетонитрила и встряхивают содержимое воронки в течение 1—2 мин. После разделения слоев нижний водный слой переливают в стаканчик, а слой ацетонитрила – в концентратор емкостью 250 мл. Водную фракцию из стаканчика переносят в делительную воронку, добавляют в воронку 30 мл ацетонитрила и экстрагируют фолпет, как указано выше. Экстракцию повторяют еще раз с тем же объемом ацетонитрила.

Объединенный экстракт ацетонитрила упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре 35 °С до объема 1—2 мл. Остаток в концентраторе разводят 100 мл 2–% раствора Na_2SO_4 и переносят в *делительную воронку емкостью 250 мл.*

Добавляют в воронку 30 мл хлористого метилена и встряхивают воронку в течение 1—2 мин. После разделения слоев нижний слой хлористого метилена сливают в концентратор, пропуская через безводный сернокислый натрий. Повторяют экстракцию еще два раза, используя каждый раз по 30 мл хлористого метилена. Хлористый метилен выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе.

9.1.2. *Очистка экстракта на колонке с флоризилом.* Сухой остаток в концентраторе разводят в 1 мл ацетона, добавляют 9 мл гексана, обмывают смесью стенки концентратора и переносят его содержимое на колонку с флоризилом. Колонку промывают последовательно 10 мл гексана и 5 мл смеси гексан–ацетон – 4 : 1, смывы отбрасывают. Фолпет элюируют с колонки 15 мл смеси гексан–ацетон. Элюат собирают в концентратор емкостью 100 мл и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток в концентраторе разводят в 1 мл ацетона и вводят в хроматограф 1 мкл пробы.

9.2. Условия хроматографирования

Хроматограф «Кристалл 2000 М» с детектором по захвату электронов (ЭЗД) с пределом детектирования по Линдану 4×10^{-14} г/см^3 и приспособлениями для капиллярной колонки или другой с аналогичными характеристиками.

Капиллярная кварцевая колонка НР-5 (5 % дифенил и 95 % диметилполисилоксан), длина 15 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,25 мкм.

Температура термостата колонки программирование: начальная температура – 160 °С, нагрев колонки по 10 °С в минуту до 210 °С. Нагрев колонки после анализа по 25 °С в минуту до 260 °С, выдержка 3 мин. Время анализа – 11 мин.

Температура испарителя – 230 °С, детектора – 320 °С.

Регулятор расхода гелия – PPF-11; режим Split less.

Газ 1 – гелий (газ-носитель), расход гелия – 1 $см^3$/мин, сброс 1 : 50, начало сброса – 20 с, длительность сброса – 2 мин.

Газ 2 – гелий, линейная скорость – 28 см/с, давление на входе – 38,21 кПа;

Газ 3 – азот (поддув в детектор), расход во время анализа – 45 $см^3$/мин. Расход азота при продувке детектора после анализа – 65 $см^3$/мин.

Абсолютное время удерживания фолпета – 6 мин 37 с—6 мин 40 с.

Объем вводимой пробы – 1 $мм^3$.

Минимально детектируемое количество фолпета в анализируемом объеме – 0,01 нг

Линейность детектирования сохраняется в пределах 0,01—0,1 нг.

Каждую анализируемую пробу вводят в хроматограф 3 раза и вычисляют среднюю площадь пика.

Образцы, дающие пики больше, чем стандартный раствор с концентрацией фолпета 0,1 мкг/$см^3$ соответственно, разбавляют.

10. Обработка результатов анализа

Для определения содержания фолпета в пробах методом ГЖХ используют следующую формулу:

$$X = \frac{S_{ПР} \times A \times V}{100 \times S_{СТ} \times m} \times P, \text{ где}$$

X – содержание фолпета в пробе, мг/кг;

$S_{СТ}$ – площадь пика стандарта, мВ;

$S_{ПР}$ – площадь пика образца, мВ;

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

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

m – масса анализируемого образца, г;

P – содержание фолпета в аналитическом стандарте, %.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 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 методом добавок.**

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

$\pm\Delta_{л,\overline{X}}(\pm\Delta_{л,\overline{X'}})$ – 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;

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_K = \overline{X'} - \overline{X} - C_д, \text{ где}$$

$\overline{X'}$, $\overline{X}$, $C_д$ – 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:

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

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 по 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, табл. 1), %.

14. Разработчики

Калинин В. А., Калинина Т. С. Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева.

Приложение

Доверительный интервал и полнота определения фолпета в виноградном соке

Анализируемый объект	Добавлено фолпета, мг/кг	Обнаружено фолпета, мг/кг	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
Сок винограда	0,02	0,021	0,002	106,2
	0,05	0,041	0,003	82,9
	0,1	0,079	0,005	79,4

Определение остаточных количеств фолпета в виноградном соке методом газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2454—09

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 31.07.09

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. 18/20

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