

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение остаточных количеств
каптана в яблочном соке методом
газожидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.2455—09**

ББК 51.21

О60

О60 **Определение остаточных количеств каптана в яблочном 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, Т. С. Калинина, ст. н. сотр., канд.с-х. наук).

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
каптана в яблочном соке методом
газожидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.2455—09**

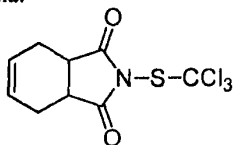
Настоящие методические указания устанавливают метод газожидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств каптана в яблочном соке в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг.

Краткая характеристика препарата

Название действующего вещества по ИСО: Каптан.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 1,2,5,6-Тetraгидро-N-трихлорметилтиофталимид.

Структурная формула:



$C_9H_8Cl_3NO_2S$

Мол. масса: 300,6

Агрегатное состояние: кристаллическое вещество.

Цвет, запах: белое вещество, почти без запаха.

Температура плавления: 178 °С.

Летучесть (давление паров): < 1,3 мПа (при 25 °С).

Растворимость: в воде $3,3 \text{ мг/дм}^3$ (при $25 \text{ }^\circ\text{C}$); в органических растворителях при $26 \text{ }^\circ\text{C}$ (г/дм^3): ксилоле – 20; толуоле – 6,9; хлороформе – 70; ацетоне – 21, циклогексаноне – 23; диоксане – 47; бензоле – 21; изопропаноле – 1,7; этаноле – 2,9; диэтиловом эфире – 2,5. Коэффициент перераспределения в системе октанол:вода: $K_{ow} \log P - 2,8$.

Стабильность в водных растворах: медленно гидролизуется в нейтральной среде, быстро разрушается в щелочной среде: $DT_{50} - 32,4 \text{ ч}$ (рН 5); $DT_{50} - 8,3 \text{ ч}$ (рН 7), $< 2 \text{ мин}$ (рН 10). Разрушается при нагревании до температуры плавления.

Краткая токсикологическая характеристика

Каптан относится к малоопасным веществам по острой оральной (LD_{50} для крыс – $9\,000 \text{ мг/кг}$), дермальной (LD_{50} для кроликов более $4\,500 \text{ мг/кг}$), но к опасным по ингаляционной токсичности (LC_{50} для крыс – 668 мг/м^3). Может вызывать раздражение кожи с сенсибилизацией и слизистых оболочек глаз, имеются ограниченные сведения о канцерогенном эффекте в опытах на животных.

В России для каптана установлены следующие гигиенические нормативы: ПДК в воде водоемов санитарно-бытового пользования – $0,2 \text{ мг/дм}^3$; в воде рыбо-хозяйственных водоемов – $0,0006 \text{ мг/дм}^3$; в почве – 1 мг/кг ; в воздухе рабочей зоны – $0,3 \text{ мг/м}^3$.

МДУ в продукции (мг/кг): содержание вещества в овощах, фруктах, ягодах, винограде, картофеле, бахчевых культурах не допускается.

Область применения

Каптан – не системный фунгицид с защитным и лечебным действием. Используется путем опрыскивания в период вегетации для борьбы с болезнями яблони и груши (парша), косточковых (кластероспориоз), земляники (пятнистость), картофеля и томатов (фитофтороз и альтернариоз) и других культур. Нормы расхода (в кг/га) на яблоне и груше $3,75-5$; на абрикосах, вишне, персиках, сливе, черешне $2,5-3,5$; на малине, крыжовнике, смородине $1,5-1,75$; на томатах и картофеле, бахчевых $1,5-2$; на землянике (до цветения и после сбора урожая) – $1,25$; на виноградной лозе $2,5-3,75$.

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_n , %	Предел повторяемости, r , %	Предел воспроизводимости, R , %
Яблочный сок	0,01—0,1	50	3,35	9	11

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 определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S , %	Доверительный интервал среднего результата, \pm , %
Яблочный сок	0,01	0,01—0,10	86,11	0,75	1,35

2. Метод измерений

Метод основан на определении каптана 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 вещества 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 $\pm 0,0001$ г, фирма «ОНАУС»
- Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности $\pm 0,038$ г V600, «ACCULAB»
- Колбы мерные вместимостью 10, 50 и 100 см³ ГОСТ 1770—74
- Микрошприц Гамильтон, вместимостью 10 мм³
- Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ ГОСТ 20292—74
- Хроматограф газовый «Кристалл 2000м» с термоионным детектором (ТИД) с пределом детектирования по азоту в азобензоле 5×10^{-13} г/см³ и приспособлениями для капиллярной колонки
- Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100 и 250 см³ ГОСТ 1770
- Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

- Аналитический стандарт каптана, содержание основного вещества 98,7 % 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/дм³ 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 ТУР LT1 фирмы «SKLO UNION»	
Банки с крышками для экстракции на 250 см ³ , полипропилен, кат.№3120-0250, NALGENE	
Воронки химические для фильтрации, стеклянные	ГОСТ 8613—75
Воронки делительные на 250 см ³	ГОСТ 10054—75
Испаритель ротационный вакуумный ИР-1М	ТУ 25-11917
Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi с водяной баней В-480	
Концентраторы грушевидные на 100 и 250 см ³ , НШ 29 КГУ – 100 (250)	ГОСТ 10394—72
Колонка хроматографическая, капиллярная кварцевая НР-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 Laborort	
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 газо-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 газо-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. Подготовка стандартных и градуировочных растворов каптана

Основной раствор каптана готовят, количественно перенося навеску вещества массой по 100 мг в мерные колбы вместимостью 100 см³. В колбы вносят 20 см³ ацетона, содержимое колб перемешивают до полного растворения кристаллов каптана. Объем раствора в колбах доводят до метки ацетоном, после чего содержимое колб тщательно перемешивают. Получают раствор каптана массовой концентрации 1 мг/см³ (раствор № 1), который может храниться не более 1 месяца.

Методом последовательного разбавления раствора № 1 ацетоном в мерных колбах готовят рабочие растворы с концентрациями каптана 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см³, которые могут храниться в холодильнике не более 10 суток.

Основной и градуировочные растворы каптана хранят в холодильнике.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации каптана в растворе устанавливают методом абсолютной калибровки по стандартным растворам с концентрациями 0,01; 0,02; 0,05 и 0,1 мкг/см³.

Для построения градуировочного графика в инжектор хроматографа вводят по 1 мм³ каждого градуировочного раствора каптана и хроматографируют в условиях п. 9.2. Проводят не менее 3 параллельных измерений и находят среднее значение площади хроматографического пика для каждой концентрации. По полученным данным строят градуировочный график зависимости площади хроматографического пика в мВ от концентрации каптана в растворе в мкг/см³.

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 сернистого натрия толщиной 1 см. Флоризил в колонке промывают 15 см³ ацетона, ацетон под давлением удаляют из колонки. Затем колонку промывают 15 см³ гексана.

7.5. Проверка хроматографического поведения каптана на колонке для очистки экстракта

Хроматографическое поведение каптана проверяют каждый раз при использовании новой партии флоризила. В стаканчик помещают 1 см³ стандартного раствора каптана с концентрацией 0,1 мкг/см³, добавляют 9 см³ гексана, перемешивают содержимое и наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 10 см³ гексана и 5 см³ смеси гексан–ацетон – 4 : 1, смывы отбрасывают.

Пропускают через колонку 4 порции смеси гексан–ацетон (1 : 1) по 5 см³ каждая, собирая их в отдельные концентраторы. Собранные фракции выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 1 см³ ацетона и вводят в хроматограф 1 мм³ пробы. Фракции, содержащие каптан, объединяют, выпаривают досуха, сухой остаток вновь растворяют в 1 см³ ацетона и вводят в хроматограф 1 мм³ 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 656—76 — «Фруктовый 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. Яблочный сок

9.1.1. *Экстракция каптана из анализируемой пробы и предварительная очистка.* Навеску сока 10 г разводят 10 см³ насыщенного раствора хлористого натрия и переносят в делительную воронку. Добавляют в воронку 50 см³ 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 см³. Водную фракцию из стаканчика переносят в делительную воронку, добавляют в воронку 30 см³ ацетонитрила и экстрагируют каптан, как указано выше. Экстракцию повторяют еще раз с тем же объемом ацетонитрила.

Объединенный экстракт ацетонитрила выпаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре 35 °С до объема 1—2 см³. Остаток в концентраторе разводят 100 см³ 2%-го раствора Na₂SO₄ и переносят в делительную воронку емкостью 250 см³.

Добавляют в воронку 30 см³ 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 см³ 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 см³ ацетона, добавляют 9 см³ гексана, обмывают стенки концентратора и переносят его содержимое на колонку с флоризилом. Колонку промывают последовательно 10 см³ гексана и 5 см³ смеси гексан—ацетон — 4 : 1, смывы отбрасывают. Фолпет элюируют с колонки 15 см³ смеси гексан—ацетон (1 : 1). Элюат собирают в концентратор емкостью 100 см³ и выпаривают досуха на ротационном

вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток в концентраторе разводят в 1 см³ ацетона и вводят в хроматограф 1 мм³кл пробы.

9.2. Условия хроматографирования

Хроматограф «Кристалл 2000.М» с детектором по захвату электронов (ЭЗД) с пределом детектирования по Линдану 4×10^{-14} г/см³ 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 запрограммированная: начальная температура – 160 °С, нагрев колонки по 6 °С в минуту до 220 °С. Нагрев колонки после анализа по 25 °С в минуту до 260 °С, выдержка 3 мин. Температура испарителя – 230 °С, детектора – 320 °С.

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

Газ 1 – гелий (газ-носитель), расход гелия – 1 см³/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 см³/мин. Расход азота при продувке детектора после анализа – 65 см³/мин.

Абсолютное время удерживания каптана – 6 мин 08 с—6 мин 14 с.

Объем вводимой пробы – 1 мм³.

Минимально детектируемое количество Каптана 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 каптана 0,1 мкг/см³ соответственно, разбавляют.

10. Обработка результатов анализа

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

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

X – содержание каптана в пробе, мг/кг;

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

$S_{пр}$ – площадь пика образца, мВ;

A – концентрация стандартного раствора, мкг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m – масса анализируемого образца, г;

P – содержание каптана 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):

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

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.

12. 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;

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

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 0,01 мг/кг»**

**- 0,01 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_d должна удовлетворять условию:

$$C_d = \Delta_{\pi, X} + \Delta_{\pi, X'}, \text{ где}$$

$\pm \Delta_{\pi, X} (\pm \Delta_{\pi, X'})$ — 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:

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

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_K рассчитывают по формуле:

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

$\overline{X'}$, \overline{X} , C_d — 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:

$$K = \sqrt{\Delta_{\pi, X'}^2 + \Delta_{\pi, X}^2}$$

Проводят сопоставление результата контроля процедуры (K_K) с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

$$|K_K| \leq K \quad (2)$$

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)

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

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
каптана в виноградном соке**

Анализируемый объект	Добавлено каптана, мг/кг	Обнаружено каптана, мг/кг	Доверительный интервал, ±	Полнота определения, %
Сок винограда	0,01	0,0087	0,0002	86,8
	0,02	0,0172	0,0008	85,8
	0,05	0,0427	0,0025	85,4
	0,1	0,0865	0,0041	86,5

**Определение остаточных количеств
каптана в яблочном соке методом
газожидкостной хроматографии**

**Методические указания
МУК 4.1.2455—09**

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 31.07.09

Формат 60x88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 1,0

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