Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пенцикурона в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3519—17

Издание официальное

Москва • 2018

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пенцикурона в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3519—17

ББК 51.23
О-60

О-60 **Определение** остаточных количеств пенцикурона в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—20 с.

ISBN 978–5–7508–1664–4

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (А. В. Довгилевич, Е. В. Довгилевич, Ю. Н. Савушкин, Е. Н. Тестова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 ноября 2017 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 29 декабря 2017 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 18.12.18

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 100 экз. Заказ 69

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
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2018

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
29 декабря 2017 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пенцикурона в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3519—17

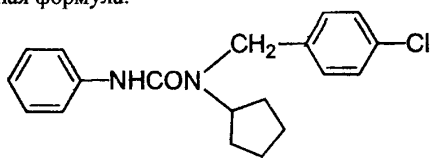
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств пенцикурона в зерне и соломе зерновых колосовых культур в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Пенцикурон

Название по ИЮПАК: 1-(4-хлоробензил)-1-циклопентил-3-фенилмочевина.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{19}H_{21}ClN_2O$.

Молекулярная масса: 328,8.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белого цвета, без запаха.

Давление насыщенного пара 5×10^{-7} Па.

Температура плавления: 128 °С.

Коэффициент распределения в системе октанол/вода при 20 °С: K_{ow} logP = 4,68.

Растворимость в воде: 0,3 мг/дм^3 при 20 °С.

В воде гидролизуется: DT_{50} – 64—302 дня при 20 °С.

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, при 20 °С): ацетон – 89,4, ацетонитрил – 24,9; гексан – 0,12; диметилсульфоксид – 152,9; хлористый метилен > 250; этилацетат – 43,8.

Пенцикурон слабо передвигается в почве, относительно стабилен, разлагается с образованием п-хлорбензиламина и п-хлорбензилформамида.

В растениях слабо разлагается с образованием гидроксилированных метаболитов (частично в виде коньюгатов).

Из организма теплокровных более 74 % выводится с мочой и фекалиями в течение 3 дней в неизменном виде и в виде метаболитов. Основной путь разложения – гидроксилирование фенильной группы с образованием диольных и триольных производных, которые быстро выводятся в виде коньюгатов с сульфатами и глюкуроновой кислотой.

Краткая токсикологическая характеристика. Пенцикурон относится к веществам, малоопасным по оральной ($ЛД_{50}$ для крыс составляет более 5 000 мг/кг) и дермальной ($ЛД_{50}$ для кроликов более 2 000 мг/кг) токсичности, но к чрезвычайно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 часа) более 268 мг/м^3, аэрозоль). Не вызывает покраснения кожи, слабо раздражает слизистую оболочку глаз. Не проявляет тератогенных и онкогенных свойств.

Область применения. Пенцикурон – контактный фунгицид с длительным защитным действием. Рекомендуется для опрыскивания и опыливания растений, для обработки семян или внесения в почву. Применяется для подавления ризоктониоза и частично фитофтороза картофеля, пирикуляриоза риса, болезней всходов хлопка, овощей, сахарной свеклы, декоративных растений.

Пенцикурон используется также в качестве компонента смесевых препаратов с имидаклопридом, тирамом и тебуконазолом.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,02 мг/кг массы человека; ОДК в почве – 0,2 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,015 мг/дм^3; ПДК в воздухе рабочей зоны – 2,0 мг/м^3; ПДК в атмосферном воздухе – 0,05 мг/м^3.

МДУ в продукции (мг/кг): картофель – 0,1.

ВМДУ в импортируемой продукции (мг/кг): зерно зерновых колосовых – 0,05.

1. Погрешность измерений

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и ее составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не превышает значений, приведенных в табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

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

Таблица 1

Метрологические параметры для пенцикурона

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности) ±δ, % $P = 0,95$	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Зерно зерновых колосовых	0,05—0,1 вкл.	50	2	5	6
	0,2—0,5 вкл.	25	2	5	7
Солома зерновых колосовых	0,05—0,1 вкл.	50	2	6	9
	0,2—0,5 вкл.	25	2	6	9

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для пенцикурона

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	полнота извлечения вещества, %	стандартное отклонение S, %	доверительный интервал среднего результата, ±, %
Зерно зерновых колосовых	0,05	0,05—0,5	85,6	2,4	1,0
Солома зерновых колосовых	0,05	0,05—0,5	75,4	2,9	1,0

2. Метод измерений

Метод основан на определении пенцикурона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органиче-

ским растворителем, очистки экстракта на колонках с флоризилом, окисью алюминия и на концентрирующих патронах № 1.

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

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

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Весы аналитические класса точности – специальный (I) с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения класса точности – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 400 г и пределом допустимой погрешности ± 0,5 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные на 10, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пипетки мерные на 1,0; 2,0 и 5,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Хроматографическая система, включающая: – хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$ для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему; – компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ	
Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$	ГОСТ 1770—74

Примечание. Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Пенцикурон, CAS 66063-05-6, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 95,8 %	
Алюминия окись для хроматографии, ч	ТУ 6-09-3916—75
Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм	ТУ 6-09-2167—84
Вода дистиллированная и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной емкости)	ГОСТ 6709—72
n-Гексан, хч	ТУ 6-09-3818—89
Калий марганцовокислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофильным слабокислым сорбентом, с постоянной активностью, с размером частиц 63—200 мкм (С) (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Натрий сернокислый безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Флоризил (Магния силикат, 99 %, CAS 1343-88-0) для колоночной хроматографии, зернение 60/100 меш	
Этилацетат, чда	ГОСТ 22300—76

Примечание. Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами	ГОСТ 25336—82
Аппарат для встряхивания проб с возвратно-поступательным направлением колебаний, с максимальной загрузкой 10 кг, с амплитудой колебаний 30 мм и скоростью от 10 до 300 колебаний в минуту	
Банки полипропиленовые с крышками для экстракции вместимостью 250 $см^3$	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Виалы объемом 2 $см^3$, закрываемые завинчивающейся или запрессовывающейся крышкой с тефлонированной резиновой прокладкой,	

прокалываемой микрошприцем для автоматического дозатора проб	
Воронки лабораторные стеклянные	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, с диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 $см^3$, с изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, с водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 $дм^3$ и с диапазоном температур от 20 до 100 °С	
Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 $см^3$ и 4 000 $см^3$ ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная длиной 150 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18	
Предколонка хроматографическая стальная длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18	
Насос диафрагменный, химически стойкий на 100 %, с мощностью электропривода 245 Вт, предельным вакуумом 100 мбар/абс, с избыточным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 $дм^3$/мин	
Стаканы стеклянные, термостойкие объемом 100—2 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом 4 000 $см^3$ и приемной конической колбой объемом 1 000 $см^3$	
Фильтры обеззоленные нейтральные быстро фильтрующие диаметром 11 см, зольность одного фильтра 0,00072 г	ТУ-6-09-1678—86
Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 $см^3$	ГОСТ 22967—90

Примечание. Допускается применение оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—90 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. 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—90.

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист, имеющий опыт работы на жидкостном хроматографе, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

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

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов № 1, колонок с флоризилом и окисью алюминия для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на концентрирующих патронах № 1, на колонках с флоризилом и окисью алюминия, установление градуировочной характеристики.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм^3. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей.

Ацетонитрил перегоняют при температуре 81,5 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 81,5 °С, отбрасывают.

7.1.2. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллированную воду помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к ней марганцовокислый калий из расчета 1 г/дм^3 и кипятят в течение 6 часов.

Собирают фракции, отогнанные при температуре 100,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 100,0 °С, отбрасывают.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление градуировочных растворов

7.2.1.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией пенцикурона 100,0 мг/см^3.

Взвешивают 10 мг пенцикурона в мерной колбе объемом 100 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 1 используют для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 1 хранят в холодильнике в течение 120 суток.

7.2.1.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией пенцикурона 10,0 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используют для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 2 хранят в холодильнике в течение 30 суток.

7.2.1.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией пенцикурона 1,0 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью аце-

тонитрила с водой в соотношении 70 : 30. Стандартный раствор № 3 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией пенцикурона 0,5 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30. Стандартный раствор № 4 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией пенцикурона 0,2 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 2 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30. Стандартный раствор № 5 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией пенцикурона 0,1 мкг/см^3.

Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30. Стандартный раствор № 6 используют для установления градуировочной характеристики и хранят в холодильнике в течение 7 суток.

7.2.1.7. Стандартные растворы пенцикурона с концентрацией 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5 и 0,25 мкг/см^3 для внесения в контрольные образцы.

Из стандартного раствора № 2 методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,5; 2,0; 1,0; 0,5 и 0,25 мкг/см^3 пенцикурона и используют их для внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы для внесения хранят в холодильнике не более месяца.

7.3. Установление градуировочной характеристики

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

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

7.4. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пенцикурона на ней

7.4.1. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 4 г флоризила с зернением 60/100 меш и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. На слой флоризила наносят слой безводного сернокислого натрия толщиной 1 см.

Непосредственно перед использованием колонку последовательно промывают 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, а затем 20 $см^3$ гексана.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения пенцикурона на колонке с флоризилом

В концентратор объемом 100 $см^3$ вносят 1 $см^3$ стандартного раствора пенцикурона в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/$см^3$ и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и наносят на подготовленную колонку. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Исходную колбу обмывают 15 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, вносят на сорбент в колонке. Элюат собирают и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пенцикурон, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

Изучение поведения пенцикурона на колонке проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии флоризила.

7.5. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пенцикурона на ней

7.5.1. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 3 г окиси алюминия с зернением 40/250 меш и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. Непосредственно перед использованием колонку промывают 10 $см^3$ ацетонитрила.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения пенцикурона на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 см^3 вносят 1 см^3 стандартного раствора пенцикурона в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см^3 и упаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и вносят на сорбент в подготовленной колонке. Элюат собирают в концентратор и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор последовательно обмывают пятью порциями по 5 см^3 ацетонитрила. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы объемом по 100 см^3 и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пенцикурон, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

Изучение поведения пенцикурона на колонке проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии окиси алюминия.

7.6. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения пенцикурона на них

7.6.1. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 см^3/мин.

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

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 10 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 см^3 гексана. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.6.2. Проверка хроматографического поведения пенцикурона на концентрирующих патронах № 1

В концентратор объемом 100 см^3 вносят 1 см^3 стандартного раствора пенцикурона в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см^3 и упаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при темпе-

ратуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на сорбент подготовленного патрона. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор обмывают последовательно двумя порциями смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 объемом по 10 $см^3$ каждая, обмывают стенки концентратора и вносят на сорбент патрона. Элюаты после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 $см^3$, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие пенцикурон, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюата.

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

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб проводится 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, а также в соответствии с ГОСТ 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р ИСО 6497—11 «Корма для животных. Отбор проб».

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

9. Выполнение определения

9.1. Зерно зерновых колосовых культур

9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 $см^3$, прибавляют 50 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 30 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через бумажный фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два

раза, используя по 50 см^3 ацетонитрила и помещая каждый раз на 15 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракты фильтруют, объединяют в концентраторе объемом 250 см^3 и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.1.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.1, растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора, наносят на подготовленную колонку, элюат собирают в концентратор. Исходную колбу обмывают 10 см^3 ацетонитрила и смыв вносят на колонку. Элюаты объединяют в концентраторе объемом 100 см^3 и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1

Сухой остаток, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 2 см^3 этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 см^3 гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленный патрон. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3. Исходный концентратор обмывают 10 см^3 смеси гексана с этилацетатом в соотношении 4 : 1 и полученный раствор вносят на патрон. Элюаты объединяют в концентраторе объемом 100 см^3, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 5 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.2. Солома зерновых колосовых культур

9.2.1. Экстракция

Образец измельченной соломы массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см^3, прибавляют 50 см^3 ацетонитрила и помещают на 30 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 см^3 через бумажный фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см^3 ацетонитрила и помещая каждый раз на 15 минут на аппарат для встряхивания проб. Экстракты фильтруют и объединяют в концентраторе объемом 250 см^3 и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.2.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.1, растворяют в 10 см^3 ацетонитрила и проводят очистку экстракта, как указано в п. 9.1.2 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия».

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с флоризилом

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2, растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, добавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленную колонку, элюат отбрасывают. Исходную колбу обмывают 15 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 2 : 1, смыв вносят на колонку, элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2,5 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70 : 30 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

9.3. Условия хроматографирования

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$ для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему;

– компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ.

Колонка хроматографическая стальная длиной 150 мм с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода в соотношении 70 : 30.

Скорость потока элюента: 0,6 $см^3$/мин.

Длина волны: 240 нм.

Чувствительность не менее 14 mAU (миллиединиц абсорбции) на шкалу.

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

10. Обработка результатов

Для обработки результатов хроматографического анализа используется компьютерное программное обеспечение химического анализа, которое входит в хроматографическую систему.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание пенцикурона в пробах рассчитывают по формуле, без учета полноты извлечения вещества из проб:

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

X – содержание пенцикурона в пробе, мг/кг;

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

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

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

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

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

P – содержание пенцикурона 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:

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

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

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

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

«*содержание вещества в пробе менее 0,05 мг/кг**».

* 0,05 мг/кг – предел обнаружения.

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений, а также контроль стабильности градуировочной характеристики осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале и по окончании каждой серии анализов.

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

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

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 2, \text{ где}$$

X – концентрация пенцикурона контрольного измерения, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора пенцикурона в ацетоне, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

2 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (A) превышает 2 %, делают вывод о невозможности применения градуировочной характеристики для дальнейших измерений. В этом случае выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики и повторяют контроль ее стабильности с использованием других градуировочных растворов пенцикурона, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

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:

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

$\pm\Delta_{л,\bar{X}}$ ($\pm\Delta_{л,\bar{X}'}$) – характеристика погрешности (абсолютная погрешность) результатов анализа, соответствующая содержанию компонента в испытуемом образце (расчетному значению содержания компонента в образце с добавкой соответственно) мг/кг, при этом:

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

$\bar{X}'$, $\bar{X}$, $C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11), содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце и концентрация добавки соответственно, мг/кг.

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

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

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

Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

R – предел воспроизводимости (в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Приложение 1

Полнота извлечения пенцикурона из зерна и соломы зерновых колосовых культур

(5 повторностей для каждой концентрации, P = 0,95)

Среда	Внесено пенцикурона, мг/кг	Обнаружено пенцикурона, мг/кг	Полнота определения, %
Зерно зерновых колосовых культур	0,05	0,0433 ± 0,0009	86,5
	0,10	0,0874 ± 0,0013	87,4
	0,20	0,1706 ± 0,0034	85,3
	0,50	0,4154 ± 0,0092	83,1
Солома зерновых колосовых культур	0,05	0,0371 ± 0,0004	74,1
	0,10	0,0736 ± 0,0020	73,6
	0,20	0,1524 ± 0,0044	76,2
	0,50	0,3892 ± 0,0082	77,8

gost.e-ecolog.ru