Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств изоксадифен-этила и изоксадифена в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2547—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 изоксадифен-этила и изоксадифена в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2547—09

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств изоксадифен-этила и изоксадифена в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом капиллярной газожидкостной хроматографии:.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—24 с.

1. Разработаны Всероссийским Научно-исследовательским институтом фитопатологии (Л. В. Дубовая, А. М. Макеев).

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

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 11.11.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,5

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

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

Содержание

1. Метрологическая характеристика метода 6
2. Метод измерений 7
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 8
3.1. Средства измерений 8
3.2. Реактивы 8
3.3. Вспомогательные устройства, материалы 9
4. Требования безопасности 10
5. Требования к квалификации операторов 10
6. Условия измерений 10
7. Подготовка к выполнению измерений 11
7.1. Приготовление рабочих растворов и материалов 11
7.2. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта 12
7.3. Проверка хроматографического поведения изоксадифен-этила изоксадифен-метила на колонке с флоризилом 12
7.4. Подготовка и кондиционирование хроматографической колонки 13
7.5. Приготовление градуировочных растворов 13
7.6. Установление градуировочной характеристики 14
8. Отбор и хранение проб 15
9. Выполнение определения 15
9.1. Экстракция изоксадифен-этила и изоксадифена 15
9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей 18
9.3. Метилирование 18
9.4. Очистка экстракта на колонке с флоризилом 19
9.4. Условия хроматографирования 19
10. Обработка результатов анализа 20
11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений 21
12. Оформление результатов 21
13. Контроль качества результатов измерений 22
14. Разработчики 23
Приложение 1. Полнота определения изоксадифен-этила в модельных матрицах (n = 5) 23
Приложение 2. Полнота определения изоксадифена в модельных матрицах (n = 5) 24

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

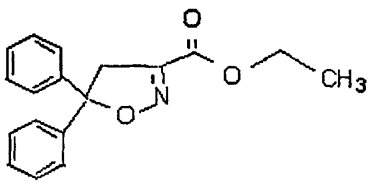
Определение остаточных количеств изоксадифен-этила и изоксадифена в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2547—09

Настоящие методические указания устанавливают метод капиллярной газожидкостной хроматографии для определения массовой концентрации изоксадифен-этила и изоксадифена в воде в диапазоне 0,001—0,01 мг/дм^3, в почве в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг, в зерне кукурузы в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг, в зеленой массе и масле кукурузы в диапазоне 0,1—1,0 мг/кг.

Название вещества по ИСО: изоксадифен-этил.

Название вещества по ИЮПАК: этил-5,5-дифенил-2-изоксазолин-3-карбоксилат.



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{17}NO_3$,
Молекулярная масса:295,3.

Химически чистый изоксадифен-этил представляет собой белый порошок. Температура плавления: 86—87 °С. Давление паров при 20 °С: $2,2 \times 10^{-6}$ Па. Коэффициент распределения н-октанол/вода: K_{ow} $\log P = 3,8$. Растворимость (г/дм^3) при 20 °С: н-гептан – 3,7, метанол – 25—30, ацетон – 200—300, этилацетат – 200—300.

Вещество стабильно при комнатной температуре, гидролитически нестабильно в нейтральной и в щелочной среде (DT_{50} составляет 2,3 и 0,02 дня при pH 7 и 9).

В биологически активных почвах в аэробных условиях изоксадифен-этил быстро разрушается (DT_{50} = 3,2—11,4 дня).

В воде, почве и растительном материале изоксадифен-этил быстро разрушается до более стабильного вещества – изоксадифена.

Краткая гигиеническая характеристика.

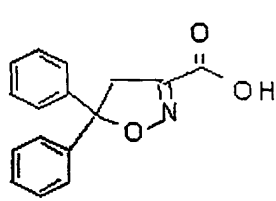
Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс 1 600—1900 мг/кг, острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 000 мг/кг, острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 5,04 мг/дм^3 воздуха. Не оказывает раздражающего действия на кожу и слизистые оболочки глаз кролика.

В России установлены следующие гигиенические нормативы.

ДСД – 0,1 мг/кг массы тела человека; ПДК в воде водоемов – 0, 005 мг/дм^3; ПДК в почве – 0,02 мг/кг; МДУ в зеленой массе, зерне и масле – 0,05 мг/кг.

Основной метаболит изоксадифен-этила: изоксадифен.

Название вещества по ИЮПК: 5,5-дифенил-2-изоксазолин-3-карбоновая кислота.



Эмпирическая формула: $C_{16}H_{13}NO_3$.

Молекулярная масса: 267,3.

Область применения.

Изоксадифен-этил является антидотом и используется для ослабления фитотоксического действия некоторых гербицидов из класса сулфонилмочевин на культурные растения. Механизм его действия связан с активизацией разрушения гербицидов в сельскохозяйственных культурах. Антидот входит в состав гербицидных препаратов, содержащих

сульфонилмочевины, применяемых для уничтожения однолетних и многолетних злаковых и широколистных сорняков в посевах кукурузы. Расход антидота не превышает 45 г д.в./га.

1. Метрологическая характеристика метода

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в 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 веществ, стандартное отклонение, доверительные интервалы среднего результата для полного диапазона концентраций ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 1

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, %
изоксадифен-этил					
Вода	от 0,001 до 0,01 вкл.	100	3,2	9,0	13,9
Почва	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	2,5	7	10,8
Зеленая масса	от 0,1 до 1,0 вкл.	25	3,9	10,9	16,9
Зерно	от 0,05 до 0,1 вкл.	50	4,1	11,5	17,8
	более 0,1 до 0,5	25	**2,8**	**7,8**	**12,1**
изоксадифен					
Вода	от 0,001 до 0,01 вкл.	100	2,8	7,8	12,1
Почва	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	**4,0**	**11,2**	**17,3**
Зеленая масса	от 0,1 до 1,0 вкл.	25	3,3	9,2	14,3
	более 0,1 до 0,5	25	2,3	6,5	10,0
Масло	от 0,1 до 1,0 вкл.	25	2,9	8,1	12,6

Таблица 2

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
изоксадифен-этил					
Вода	0,001	0,001—0,01	90,2	3,2	± 3,0
Почва	0,01	0,01—0,1	85,5	3,0	± 2,8
Зеленая масса	0,1	0,1—1,0	84,7	3,6	± 3,4
Зерно	0,05	0,05—0,5	84,3	3,5	± 3,3
изоксадифен					
Вода	0,001	0,001—0,01	88,5	2,9	± 2,7
Почва	0,01	0,01—0,1	85,5	4,0	± 3,8
Зеленая масса	0,1	0,1—1,0	83,9	3,3	± 3,1
Зерно	0,05	0,05—0,5	85,1	3,4	± 3,2
Масло	0,1	0,1—1,0	82,2	2,8	± 2,7

2. Метод измерений

Методика основана на определении изоксадифен-этила и изоксадифена с помощью капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с термоионным детектором (ТИД). Контроль изоксадифен-этила и его метаболита (в виде метильного производного) в образцах осуществляется по содержанию веществ после их экстракции из воды соответственно гексаном и хлористым метиленом, из почвы, зеленой массы и зерна кукурузы подкисленным водным ацетонитрилом, из масла ацетонитрилом, предварительной очистки экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, метилирования метаболита диазометаном и окончательной очистки экстрактов на колонке с флоризилом.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Избирательность обеспечивается путем подбора капиллярной колонки и условий программирования температуры.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Газовый хроматограф «Кристалл 2000М» с ТИД (СКБ «Хроматэк», Россия)	Номер Госреестра № 14516—95
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,036 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные вместимостью 2-50-2, 2-100-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2 класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 5 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2 класса точности вместимостью 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Изоксадифен-этил, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 98,7 % (Байер, Германия)	
Изоксадифен, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 98,3 % (Байер, Германия)	
Аммония ацетат	ГОСТ 3765
Ацетонитрил для хроматографии, х.ч.	ТУ 6-09-3534
Вода дистиллированная или деионизованная	ГОСТ 6702
н-Гексан, х.ч.	ТУ 6-09-3375
Калия гидроксид, ч.	ГОСТ 24363
Кислота серная концентрированная, х.ч.	ГОСТ 4204
Кислота уксусная ледяная, ч.д.а.	ГОСТ 61
Кислота хлористоводородная, х.ч.	ГОСТ 3118
N-метил-N-нитрозо-п-толуолсульфонамид (Мерк, Германия)	
или N-нитрозо-метилмочевина	ТУ 6-09-11-1643

Метилен хлористый (дихлорметан), х.ч.	ГОСТ 12794
Натрий сернокислый, безводный, х.ч.	ГОСТ 4166
Спирт метиловый (метанол), х.ч.	ГОСТ 6995
Этиловый эфир уксусной кислоты, ч.	ГОСТ 22300
Эфир диэтиловый	ГОСТ 6562

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Азот газообразный (баллон), осч	ГОСТ 9293
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851
Ванна ультразвуковая, модель D-50, Branson Instr. Co. (США)	
Вата медицинская	
Воронки химические для фильтрования, стеклянные	ГОСТ 8613
Воронки делительные вместимостью 100, 250 и 500 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронка Бюхнера	ГОСТ 0147
Генератор водорода, мод. SPE, фирма General Electric (США) или аналогичный	
Гомогенизатор Omni-mixer (Sorvall,США) или аналогичный	
Иономер ЭВ-74 или аналогичный	ГОСТ 22261
Колба Бунзена	ГОСТ 5614
Колбы плоскодонные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 50, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 9737
Колонка хроматографическая, капиллярная кварцевая ZB-1 (типа SE-30), длина 20 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,5 мкм, фирма Phenomenex (США) или аналогичная	
Колонка хроматографическая стеклянная, длиной 25 см, внутренним диаметром 8—10 мм	ГОСТ 9737
Компрессор (СКБ «Хроматэк», Россия)	
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М	
Или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi (Швейцария)	ТУ 25-11-917
Стаканы химические вместимостью 50, 100, 250 и 500 $см^3$	ГОСТ 25336

Стекловата
Фильтры бумажные «красная лента»,
Обеззоленные ТУ 6-09-2678
Флоризил для колоночной хроматографии
с размером частиц 60—80 меш (Мерк, Германия)
Шприц для ввода образцов для газового
Хроматографа вместимостью 1—10 мм^3
(Hamilton, США)

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 газовом хроматографе.

К подготовке проб 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 газовом хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка колонки с флоризилом, установление градуировочной характеристики.

7.1. Приготовление рабочих растворов и материалов

7.1.1. Приготовление 10%- и 40%-ного растворов гидроксида калия. Растворы готовят под тягой, строго соблюдая технику безопасности.

В химический стакан вместимостью 250 $см^3$ помещают соответственно10 или 40 г гидроксида калия, приливают 90 или 60 $см^3$ дистиллированной воды и осторожно перемешивают до полного растворения осадка.

7.1.2. Приготовление 5 %-го раствора серной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 500—600 $см^3$ дистиллированной воды, по каплям вносят 52,5 $см^3$ концентрированной серной кислоты, перемешивают, доводят объем водой до метки и вновь перемешивают.

7.1.3. Приготовление 0,1М водного раствора ацетата аммония. В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ помещают 7,71 г ацетата аммония, приливают 200 $см^3$ дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения осадка. В раствор вносят 2 $см^3$ ледяной уксусной кислоты, доводят объем водой до метки и перемешивают.

7.1.4. Приготовление 0,1 N раствора соляной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, содержащую 200—300 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют 8,5 $см^3$ соляной кислоты (уд. вес 1,18), перемешивают и доводят объем водой до метки.

7.1.5. Приготовление 1%-ного раствора уксусной кислоты. Переносят 10 $см^3$ ледяной уксусной кислоты в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, добавляют 500 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают и доводят объем водой до метки.

7.1.6. Очистка флоризила. Флоризил встряхивают с двойным объемом очищенного ацетона и затем фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Сорбент на фильтре промывают 1,5 объемом ацетона и затем высушивают при температуре 130 °С в течение 3 ч.

7.1.7. Приготовление эфирного раствора диазометана. В двугорлой круглодонной колбе вместимостью 100 $см^3$, снабженной капельной воронкой, растворяли 5 г N-метил-N-нитрозо-п-толуолсульфонамида в 30 $см^3$ смеси диэтилового эфира и метанола (1 : 1, по объему). Колбу присоединяют к холодильнику, нижний конец которого снабжен аллонжем с отводом, погруженным в слой диэтилового эфира (100 $см^3$) в

приемной колбе, охлаждаемой смесью льда и соли. В воронку помещают 15 см^3 40 %-го раствора гидроксида калия. Реакцию начинают добавлением в реакционный сосуд раствора гидроксида калия по каплям, избегая бурного вскипания реакционной массы. Об окончании реакции судят по прекращению выделения диазометана в диэтиловый эфир. Раствор диазометана хранят в колбе с притертой пробкой в холодильнике не более пяти дней.

7.2. Подготовка колонки с флоризилом для очистки экстракта

В нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм помещают тампон из стекловаты и затем в нее выливают суспензию 5 г флоризила в 10 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего слоя сорбента и помещают на него слой безводного сернокислого натрия высотой 1 см. Колонку промывают 15 см^3 гексана, после чего она готова к работе.

7.3. Проверка хроматографического поведения изоксадифен-этила изоксадифен-метила на колонке с флоризилом

При отработке методики или поступлении новой партии флоризила проводят изучение поведения анализируемых веществ на колонке. В стакан вместимостью 50 см^3 помещают 1 см^3 стандартного раствора изоксадифен-этила в смеси гексан-этилацетат (1 : 1, по объему) с концентрацией 10 мкг/см^3, добавляют 4 см^3 гексана, перемешивают содержимое и наносят на колонку с флоризилом, подготовленную по п. 7.2. Промывают колонку 30 см^3 гексана со скоростью 1—2 кап./сек., элюат отбрасывают. Затем через колонку пропускают 40 см^3 смеси гексан-этилацетат (85 : 15, по объему), отбирая последовательно по 5 см^3 элюата. Каждую фракцию выпаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С досуха, остатки растворяют в 1 см^3 смеси гексан-этилацетат (1 : 1), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание изоксадифен-этила по п. 9.5. По результатам обнаружения изоксадифен-этила в каждой фракции определяют объем смеси гексан-этилацетат (85 : 15, по объему), необходимый для полного вымывания антидота с колонки.

Аналогичным образом проводится проверка хроматографического поведения метильного производного изоксадифена (изоксадифен-метил) на колонке с флоризилом.

7.4. Подготовка и кондиционирование хроматографической колонки

Капиллярную кварцевую колонку ZB-1 (типа SE-30) устанавливают в термостат хроматографа, и, не подсоединяя к детектору, кондиционируют при температуре 280 °С и скорости газа-носителя 2 $см^3$/мин в течение 8—10 ч.

7.5. Приготовление градуировочных растворов

7.5.1. Исходный раствор изоксадифен-этила для градуировки (концентрация 200 мкг/$см^3$). В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 0, 020 г изоксадифен-этила (аналитический стандарт), растворяют в 40—50 $см^3$ ацетона, доводят объем этим же растворителем до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранят в морозильной камере при температуре не выше – 18 °С в течение 3 месяцев.

7.5.2. Раствор изоксадифен-этила № 1 для градуировки (концентрация 20 мкг/$см^3$). В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 10 $см^3$ исходного раствора изоксадифен-этила с концентрацией 200 мкг/$см^3$(п. 7.5.1), разбавляют смесью гексан–этилацетат (1 : 1, по объему) до метки. Этот раствор используют для приготовления рабочих градуировочных растворов №№ 2—5.

Для приготовления проб воды, почвы, зеленой массы и зерна с внесением при оценке полноты извлечения изоксадифен-этила из исследуемых образцов используют ацетоновые растворы антидота с концентрациями 1 и 10 мкг/$см^3$.

Градуировочный раствор № 1 и ацетоновые растворы изоксадифен-этила хранят в морозильной камере при температуре не выше – 18 °С в течение месяца.

7.5.3. Рабочие растворы №№ 2—5 изоксадифен-этила для градуировки (концентрация (0,2—2,0 мкг/$см^3$). В 4 мерные колбы вместимостью 100 $см^3$помещают 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 $см^3$ градуировочного раствора № 1 изоксадифен-этила с концентрацией 20 мкг/$см^3$ (п. 7.5.2), доводят объем смесью гексан-этилацетат (1 : 1) до метки, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2—5 с концентрацией антидота 0,2; 0,4; 1,0 и 2,0 мкг/$см^3$ соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

7.5.4. Исходный раствор изоксадифена для градуировки (концентрация 500 мкг/$см^3$). В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 0, 051 г изоксадифена (аналитический стандарт), растворяют в 40—50 $см^3$ метанола, доводят объем этим же растворителем до метки, тща-

тельно перемешивают. Раствор хранят в морозильной камере при температуре не выше – 18 °С в течение месяца.

7.5.5. Раствор изоксадифена № 1 для градуировки (концентрация 200 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 20 см^3 исходного раствора изоксадифена с концентрацией 500 мкг/см^3(п. 7.5.4), разбавляют метанолом до метки. Этот раствор используют для приготовления рабочих градуировочных растворов метильного производного изоксадифена.

Для приготовления проб воды, почвы, зеленой массы и зерна с внесением при оценке полноты извлечения изоксадифена из исследуемых образцов используют растворы метаболита в смеси метанол-1 %-ный раствор CH_3COOH (1 : 1, по объему) с концентрациями 1 и 10 мкг/см^3, а для приготовления проб масла используют ацетоновые растворы изоксадифена с концентрациями 1 и 10 мкг/см^3.

Градуировочный раствор № 1 и метанольные растворы изоксадифена хранят в морозильной камере при температуре не выше – 18 °С в течение месяца, а ацетоновые растворы в течение трех дней.

7.5.6. Приготовление градуировочных растворов метильного производного изоксадифена. Стандартные растворы метильного производного изоксадифена используют для построения градуировочного графика. В грушевидную колбу вместимостью 50 см^3 отбирают 1 см^3 градуировочного раствора изоксадифена № 1, приливают 4 см^3 эфирного раствора диазометана (п. 7.1.7), перемешивают и колбу закрывают пробкой. Колбу периодически встряхивают. Через 30 мин содержимое колбы упаривают досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 30 °С. К сухому остатку приливают 10 см^3 смеси гексан–этилацетат (1 : 1, по объему), перемешивают и раствор метильного производного изоксадифена переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3. Грушевидную колбу обмывают еще два раза порциями по 10 см^3 смеси гексан–этилацетат (1 : 1, по объему), которые также переносят в мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят этой же смесью до метки и получают рабочий раствор с концентрацией 4,0 мкг/см^3 (по изоксадифену). Из него последовательным разбавлением в смеси гексан-этилацетат (1 : 1) готовят рабочие растворы для градуировки с концентрациями 0,2; 0,4; 1,0 и 2,0 мкг/см^3. Растворы готовят непосредственно перед использованием.

7.6. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мВ*с) от концентрации изоксадифен-этила и изоксадифена в

растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 рабочим растворам для градуировки (пп. 7.5.3, 7.5.6).

В испаритель хроматографа вводят по 1 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

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.) и правилами, определенными ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 1743.01—83 «Почвы. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 26950—89 «Почвы. Отбор проб», ГОСТ Р 50436—92 «Зерновые. Отбор проб зерна».

Пробы воды анализируют в день отбора или замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильнике при температуре – 18 °С не более 2 недель. Образцы почвы подсушивают на воздухе в темноте, помещают в герметичную полиэтиленовую тару и хранят в холодильнике при температуре 4—6 °С не более 4 недель. Для длительного хранения образцы почвы замораживают и хранят при температуре – 18 °С. Пробы зеленой массы кукурузы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 1 дня; для длительного хранения пробы замораживают и хранят при – 18 °С. Пробы зерна подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов. Пробы масла хранят в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 0—4 °С.

Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр, образцы почвы просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм, зерно размалывают на мельнице, а зеленую массу измельчают ножом или ножницами.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция изоксадифен-этила и изоксадифена

9.1.1. Вода. 200 см^3 предварительно отфильтрованной воды (pH ≤ 6) помещают в делительную воронку вместимостью 500 см^3, добавляют 30 см^3 гексана и интенсивно встряхивают воронку в течение 2 мин. После разделения фаз верхний органический слой отделяют, фильтруют

через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу. Водную фазу экстрагируют гексаном еще дважды порциями по 30 $см^3$. Объединенную гексановую фракцию, содержащую изоксадифен-этил, упаривают досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 30 °С. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.4.

Водную фазу, оставшуюся после экстракции гексаном, переносят в химический стакан вместимостью 500 $см^3$, подкисляют 5 %-ной H_2SO_4 до pH 1 и переносят в делительную воронку вместимостью 500 $см^3$. Добавляют 30 $см^3$ хлористого метилена и интенсивно встряхивают воронку в течение 1 мин. После разделения фаз органический слой отделяют и фильтруют через слой ваты в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$, а оставшуюся водную фазу еще дважды обрабатывают хлористым метиленом порциями по 30 $см^3$. Объединенную дихлорметановую фракцию, содержащую изоксадифен, упаривают досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 30 °С. Для удаления следов влаги к остатку двукратно приливают по 2 $см^3$ ацетонитрила и упаривают досуха при указанных выше условиях. Дальнейшую обработку экстракта проводят по п. 9.3.

9.1.2. Почва. Образец воздушно-сухой почвы массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ смеси ацетонитрил-0,1М раствор ацетата аммония (7 : 3, по объему), перемешивают и колбу помещают на встряхиватель на 40 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 $см^3$. Осадок переносят в колбу и повторно экстрагируют 50 $см^3$ смеси ацетонитрил-0,1М раствор ацетата аммония (7 : 3) в течение 30 мин при встряхивании. Суспензию фильтруют и осадок на фильтре промывают 50 $см^3$ ацетонитрила. Экстракты и промывную жидкость объединяют, переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 $см^3$ и упаривают на роторном вакуумном испарителе до водного остатка (около 30 $см^3$). К водному остатку приливают деионизованную воду до объема 40 $см^3$. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

9.1.3. Зеленая масса. Навеску (20 г) измельченного растительного материала помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 $см^3$, приливают 100 $см^3$ смеси ацетонитрил-0,1N HCl (8 : 2, по объему) и гомогенизируют 3 мин при 10 000 об/мин. Гомогенат фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 $см^3$. Осадок на фильтре промывают 100 $см^3$ приведенной выше смеси. Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора и 1/4 его

часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3. В воронку вносят 10 см^3 гексана, интенсивно встряхивают 1 мин. После разделения фаз нижний ацетонитрильный слой собирают в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, упаривают до водного остатка (5—7 см^3) на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. К водному остатку добавляют деионизованную воду до объема 40 см^3. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

9.1.4. Зерно. Образец размолотого зерна массой 10 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, добавляют 100 см^3 смеси ацетонитрил-0,1N HCl (8 : 2, по объему) и колбу помещают на аппарат для встряхивания на 40 мин. Суспензию фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр в колбу Бунзена вместимостью 250 см^3. Осадок на фильтре промывают 50 см^3 приведенной выше смеси. Экстракт и промывную жидкость переносят в химический стакан, перемешивают, измеряют объем раствора и 1/2 его часть (эквивалентную 5 г образца) переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3. В воронку вносят 10 см^3 гексана, интенсивно встряхивают 1 мин. После разделения фаз нижний ацетонитрильный слой собирают в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, упаривают до водной фазы (7—10 см^3) на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. К водному остатку добавляют деионизованную воду до объема 40 см^3. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.2.

9.1.5. Масло. К образцу масла массой 5 г, помещенного в плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3, добавляют 10 см^3 гексана и 50 см^3 ацетонитрила, перемешивают и колбу помещают на встряхиватель на 30 мин. Эмульсию переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3 и после разделения фаз декантируют ацетонитрильный слой в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 через слой ваты, помещенной в конусную воронку. К оставшемуся в колбе маслу приливают 30 см^3 ацетонитрила и операцию экстракции повторяют. После декантации ацетонитрильного слоя вату промывают 10 см^3 ацетонитрила, которые объединяют с фильтратом. Объединенную ацетонитрильную фазу, содержащую изоксадифен, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, добавляют 15 см^3 гексана и воронку встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз нижний ацетонитрильный слой переносят в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, упаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. К остатку приливают 2 см^3 метанола, перемешивают в течение минуты и раствор декантируют в грушевидную колбу вместимостью

50 см^3. Маслянистый остаток еще дважды обрабатывают метанолом порциями по 2 см^3. Объединенный метанольный раствор упаривают досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 30 °С. Дальнейшую обработку экстракта проводят по п. 9.3.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток, полученный по пп. 9.1.2, 9.1.3 и 9.1.4, переносят в химический стакан вместимостью 100 см^3, доводят его pH до ~5 путем добавления 5 % H_2SO_4 или 10 % КОН и переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3. В воронку вносят 30 см^3 гексана и смесь интенсивно встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз верхний органический слой фильтруют через слой безводного сульфата натрия в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3. Экстракцию водной фазы повторяют еще два раза, используя 30 и 20 см^3 гексана. Объединенную гексановую фракцию, содержащую изоксадифен-этил, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 30 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.4.

Оставшуюся после обработки гексаном водную фазу переносят в химический стакан, подкисляют 5 % H_2SO_4 до pH 1 и переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3. Приливают 30 см^3 хлористого метилена и воронку встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев отделяют дихлорметановую фракцию, которую фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 через слой ваты, помещенный в конусную воронку. Экстракцию водной фазы повторяют еще два раза, используя 30 и 20 см^3 хлористого метилена. Объединенный дихлорметановый экстракт, содержащий изоксадифен, упаривают досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 30 °С. Для удаления следов влаги к остатку двукратно приливают по 2 см^3 ацетонитрила и упаривают досуха при указанных выше условиях. Дальнейшую обработку экстракта проводят по п. 9.3.

9.3. Метилирование

Сухой остаток в круглодонной колбе, полученный по пп. 9.1.1, 9.1.5, 9.2 и содержащий изоксадифен, растворяют в 1 см^3 метанола, добавляют 4 см^3 эфирного раствора диазометана (п. 7.1.7), перемешивают и колбу закрывают пробкой. Колбу периодически встряхивают. Через 30 мин содержимое колбы упаривают досуха на роторном вакуумном испарителе при температуре 30 °С и остаток подвергают очистке на колонке с флоризилом по п. 9.4.

9.4. Очистка экстракта на колонке с флоризилом

Сухой остаток в круглодонной колбе, полученный по пп. 9.1.1, 9.2. и 9.3, растворяют в 3 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (9 : 1, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и раствор наносят на колонку с флоризилом, подготовленную по п. 7.2. Колбу обмывают 2 $см^3$ приведенной выше смеси, которые также наносят на колонку. Промывают колонку 30 $см^3$ гексана со скоростью 1—2 кап./сек, элюат отбрасывают. Изоксадифен-этил и метильное производное изоксадифена (изоксадифен-метил) элюируют с колонки 30 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (85 : 15, по объему), собирая элюат непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 50 $см^3$. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. Сухие остатки экстрактов воды и почвы растворяют в 1 $см^3$, зерна в 1,25 $см^3$, зеленой массы и масла в 2,5 $см^3$ смеси гексан–этилацетат (1 : 1, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин, и анализируют на содержание изоксадифен-этила и изоксадифен-метила по п. 9.5.

9.4. Условия хроматографирования

Хроматограф «Кристалл 2 000М» с термоионным детектором на азотсодержащие вещества с пределом детектирования не выше $2{,}82 \times 10^{-14}$ г/$см^3$ или другой с аналогичными характеристиками.

Колонка капиллярная кварцевая ZB-1 (типа SE-30), длина 20 м, внутренний диаметр 0,32 мм, толщина пленки 0,5 мкм, фирма Phenomenex (США).

Температура термостата колонки программированная: от 150 °С (2 мин) со скоростью 20 °С/мин до 230 °С (0 мин.); со скоростью 5 °С/мин до 240 °С (5 мин.); со скоростью 20 °С/мин до 260 °С (10 мин).

Температура испарителя – 270 °С, детектора – 300 °С.

Расход газов: газа-носителя (азот) – 2,2 $см^3$/мин; поддувочного газа через детектор – 36 $см^3$/мин; водорода и воздуха к ТИД – 12 и 180 $см^3$/мин соответственно

Деление потока: 1 : 0,9.

Время удерживания изоксадифен-этила: 7,54 мин ± 2 %.

Время удерживания изоксадифен-метила: 7,25 мин ± 2 %.

Объем вводимой пробы: 1 $мм^3$.

Минимально детектируемое количество изоксадифен-этила (а также изоксадифен-метила): 0,2 нг.

Линейный диапазон детектирования: 0,2—2,5 нг.

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

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 2,0 мкг/см^3, разбавляют смесью гексан–этилацетат (1 : 1).

10. Обработка результатов анализа

Для обработки результатов хроматографического анализа используется программа сбора и обработки хроматографической информации «Хроматэк Аналитик », версия 1.20.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание изоксадифен-этила рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X – содержание изоксадифен-этила в пробе, мг/дм^3, мг/кг;

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

$S_{ПР}$ – площадь пика образца, мВ*с;

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

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

m – масса анализируемой части образца (см^3, г) /для воды – 200 см^3; для почвы – 20 г,

для зеленой массы, зерна и масла – 5 г.

Содержание изоксадифена рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

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

X – содержание изоксадифен-этила в пробе, мг/дм^3, мг/кг;

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

$S_{ПР}$ – площадь пика образца, мВ*с;

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

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

m – масса анализируемой части образца (см^3, г) /для воды – 200 см^3; для почвы – 20 г,

для зеленой массы, зерна и масла – 5 г.

При расчете содержания изоксадифена в эквивалентах изоксадифен-этила полученное значение X умножают на 1,10.

Результаты определения изоксадифен-этила и изоксадифена суммируют и сравнивают с утвержденными гигиеническими нормативами.

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 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.

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

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

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

«содержание вещества в пробе менее нижней границы определения»

*< 0,001 мг/дм^3 для воды**

*< 0,01 мг/кг для почвы***

*< 0,05 мг/кг для зерна****

*< 0,1 мг/кг для зеленой массы и масла*****

**- 0,001 мг/дм^3 – предел обнаружения для воды.*

***- 0,01 мг/кг – предел обнаружения для почвы.*

****- 0,05 мг/кг – предел обнаружения для зерна.*

*****- 0,1 мг/кг – предел обнаружения для зеленой массы и масла.*

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:

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

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

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\Delta,$$

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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, 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 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

Дубовая Л. В., науч. сотр., Макеев А. М., зав. лаб., канд. биол. наук.

ГНУ ВНИИ фитопатологии, 143050, Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел. 992-92-20.

Приложение 1

Полнота определения изоксадифен-этила в модельных матрицах ($n = 5$)

Анализируемый объект	Добавлено изоксадифен-этила, мг/дм^3, мг/кг	Открыто, %	Доверительный интервал среднего (%), ±
1	2	3	4
Вода	0,001	88,1	± 3,7
	0,002	88,4	± 2,1
	0,005	92,1	± 3,0
	0,01	92,2	± 1,8

1	2	3	4
Почва	0,01	83,5	± 2,9
	0,02	84,4	± 2,7
	0,05	85,8	± 2,5
	0,1	88,2	± 2,4
Зеленая масса	0,1	83,1	**± 4,5**
	0,2	85,0	**± 3,4**
	0,5	86,6	± 4,0
	1,0	**87,6**	± 3,0
Зерно	**0,05**	**82,8**	**± 4,7**
	0,1	83,1	± 3,3
	0,25	84,4	± 2,9
	0,5	86,8	± 2,6

Приложение **2**

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

Анализируемый объект	Добавлено изоксадифена, мг/дм^3, мг/кг	Открыто, %	Доверительный интервал среднего (%), ±
Вода	0,001	87,2	± 3,2
	0,002	86,8	± 2,2
	0,005	88,8	± 2,5
	0,01	91,0	± 1,9
Почва	0,01	82,8	± 4,6
	0,02	83,6	± 3,7
	0,05	86,6	± 2,4
	0,1	89,0	± 2,3
Зеленая масса	0,1	81,6	± 3,8
	0,2	83,6	± 2,9
	0,5	**84,1**	± 2,8
	1,0	**86,2**	± 2,5
Зерно	0,05	82,6	± 4,2
	0,1	84,4	± 2,6
	0,25	85,2	± 2,2
	0,5	88,2	± 1,9
Масло	0,1	80,4	± 3,3
	0,2	82,2	± 3,3
	0,5	82,6	± 3,0
	1,0	83,7	± 2,1

gost.e-ecolog.ru