Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств карфентразон-этила по метаболиту карфентразону в зерне кукурузы, семенах подсолнечника и рапса, растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2378—08

Издание официальное

Москва • 2009

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 карфентразон-этила по метаболиту карфентразону в зерне кукурузы, семенах подсолнечника и рапса, растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2378-08

ББК 51.21

О 60

О 60 **Определение** остаточных количеств карфентразон-этила по метаболиту карфентразону в зерне кукурузы, семенах подсолнечника и рапса, растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Рос потребнадзора, 2009. – 22 с.

1. Разработаны Федеральным научным центром гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана (Юдина Т.В., Федорова Н.Е., Волкова В.Н., Иванов Г.Е.).
2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно- эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 3 апреля 2008 г. № 1).
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 июля 2008 г.
4. Введены в действие с 5 сентября 2008 г.
5. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60х88/16 **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

Тиражировано 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

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

«2» июля 2008 г.

Дата введения: 5 сентября 2008 г.

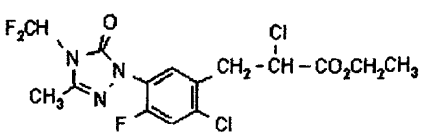
4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств карфентразон-этила по метаболиту карфентразону в зерне кукурузы, семенах подсолнечника и рапса, растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2378-08

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения в зерне кукурузы, семенах подсолнечника, рапса и растительных маслах (кукурузы, подсолнечника, рапса) массовых концентраций карфентразон-этила по метаболиту карфентразону в диапазоне 0,01 – 0,1 мг/кг.

(R,S)-2-хлор-3-[2-хлор-5-(4-дифторметил-4,5-дигидро-3-метил-5-оксо-1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)-4-фторфенил] пропионовой кислоты этиловый эфир (IUPAC)



$C_{15}H_{14}Cl_2F_3N_3O_3$
Мол. масса 412,2

Химически чистый карфентразон-этил представляет собой вязкую желтую жидкость с легким нефтяным запахом. Температура плавления – 22,1^{0}С, температура кипения 350-355^{0}С/760 мм рт. ст. Давление паров при 25^{0}С: 1,6 х 10^{-2} мПа. Растворимость в толуоле – 0,9; гексане – 0,03 (г/см^3, 20^{0}С); смешивается во всех соотношениях с ацетоном, дихлорметаном, этанолом и этилацетатом. Растворимость в воде – 12 мг/см^3 (при 20^{0}С), 22 мг/см^3 (при 25^{0}С); 23 мг/см^3 (при 30^{0}С). Коэффициент распределения в системе октанол/вода: K_{ow}logP = 3,36.

Карфентразон-этил в водной среде гидролитически стабилен при pH 5, в нейтральной и щелочной среде подвержен гидролизу: DT50 3,6 ч (pH 9), 8,6 дней (pH 7). Фотолитически не стабилен: DT50 - 8 дней.

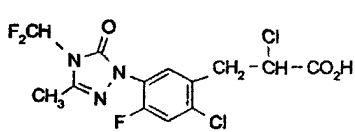
Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD $_{50}$) для крыс – 5143 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD $_{50}$) для крыс > 4000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (*LK$_{50}$*) для крыс > 5 мг/дм^3 (4 часа).

Основным продуктом гидролитического разложения (метаболитом) карфентразон-этила в растениях, воде, почве является карфентразон (кислота).

Карфентразон

(R,S)-2-хлор-3-[2-хлор-5-(4-дифторметил-4,5-дигидро-3-метил-5-оксо-1*H*-1,2,4-триазол-1-ил)-4-фторфенил] пропионовая кислота (IUPAC)



$C_{13}H_{10}Cl_2F_3N_3O_3$
Мол. масса 384,2

Область применения препарата

Карфентразон-этил – гербицид системного действия из группы триазолинонов, хорошо приникающий в растения через листья, но слабо передвигающийся по растению. Механизм действия связан с ингибированием активности протопорфирингеноксидазы. Высокоэффективен против широкого спектра двудольных сорняков.

МДУ карфентазон-этила в зерне и масле кукурузы, семенах и масле подсолнечника и рапса – 0,02 мг/г.

Метрологические характеристики метода

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

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, % P=0,95	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемо-сти, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Зерно кукурузы	от 0,01 до 0,1	50	8,0	22	26
Семена рапса	от 0,01 до 0,1	50	7,2	20	24
Семена подсолнечника	от 0,01 до 0,1	50	7,2	20	24
Кукурузное масло	от 0,01 до 0,1	50	7,8	22	26
Рапсовое масло	от 0,01 до 0,1	50	7,6	21	25
Подсолнечное масло	от 0,01 до 0,1	50	7,5	21	25

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для полного диапазона концентраций (n = 20) приведены в таблице 2.

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, ±, %
Зерно кукурузы	0,01	0,01 – 0,1	85,3	6,0	8,3
Семена рапса	0,01	0,01 – 0,1	83,2	5,0	6,9

Семена подсолнечника	0,01	0,01 – 0,1	83,4	5,6	7,8
Кукурузное масло	0,01	0,01 – 0,1	88,6	6,4	8,9
Рапсовое масло	0,01	0,01 – 0,1	86,2	6,0	8,3
Подсолнечное масло	0,01	0,01 – 0,1	84,8	5,4	7,5

2. Метод измерений

Методика основана на определении карфентразон-этила по метаболиту карфентразону с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором (УФ) после его экстракции из анализируемых проб смесью ацетонитрил-водауксусная кислота, очистки экстракта перераспределением между несмешивающимися фазами и на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях определения метод специфичен в присутствии 2,4-Д.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором *с переменной длиной волны (фирмы* Perkin-Elmer, США)	Номер Госреестра 15945-97
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности +/- 0,038 г	ГОСТ 7328
Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 и 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные вместимостью 10 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 200 и 1000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Карфентразон, аналитический стандарт с содержанием основного вещества 99,3% (фирма ФМС) или Карфентразона натриевая соль с содержанием основного вещества 99,2% (СОП 74-07 , НПК «БЛОК-1»)	
Силикагель Si 60, для колоночной хроматографии, 0.2-0.5 мм (фирмы «Мерк», Германия)	
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ-6-09-4326-76
Вода деионизованная	ГОСТ 6702
н-Гексан, хч	ТУ-6-09-3375
Изопропиловый спирт (пропанол-2), хч	ТУ 6-09-402-75
Калий гидроксид, осч	ОСТ 6-01-301
Кислота орто-фосфорная, хч, 85%	ГОСТ 6552
Кислота серная, хч	ГОСТ 4204
Кислота уксусная, ледяная, хч	ГОСТ 61
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794
Натрий углекислый кислый (бикарбонат), хч	ГОСТ 4201
Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), ч	ГОСТ 22300

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

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851-78
Аквадистиллятор	ГОСТ 22340
Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Бумажные фильтры «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	ТУ 6-09-2678-77
Воронка Бюхнера	ГОСТ 25336
Воронки делительные вместимостью 100, 250 и 500 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30-37 и 60 мм	ГОСТ 25336
Груша резиновая	
Дефлегматор елочный	ГОСТ 9773
Индикаторная бумага универсальная	
Колба Бунзена	ГОСТ 25336
Колбы плоскодонные вместимостью 100, 250 и 400 $см^3$	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 100, 250 и 500 $см^3$	ГОСТ 9737
Мембранные фильтры капроновые, диаметром 47 мм	
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696
Ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	

Стаканы химические, вместимостью 10, 250 и 400 см^3	ГОСТ 25336
Стекловата	
Стеклянная колонка длиной 25 см, внутренним диаметром 8-10 мм	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 2,0 мм, содержащая Сферисорб S 5 ODS 2, зернением 5 мкм	
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50 – 100 мм^3	

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 жидкостной хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313-03 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда - по ГОСТ 12.0.004.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

• процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20±5)^{0}С и относительной влажности не более 80%.

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

7. Подготовка к выполнению измерений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, градуировочных растворов и растворов внесения, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонке, отбор проб.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.2. Очистка этилацетата

Этилацетат промывают последовательно 5%-ным водным раствором карбоната натрия, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над безводным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 50.

7.1.3. Очистка н-гексана и хлористого метилена

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты, до тех пор, пока она не перестанет окраши-

ваться в желтый цвет, водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.2. Приготовление смеси растворителей для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 900 см^3 ацетонитрила, 100 см^3 дистиллированной воды и 10 см^3 уксусной кислоты, тщательно перемешивают.

7.3. Приготовление 2% раствора уксусной кислоты в этилацетате

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 600-700 см^3 этилацетата, вносят 20 см^3 уксусной кислоты, тщательно перемешивают.

7.4. Приготовление 0,2 N раствора гидроксида калия

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 11,2 г гидроксида калия, растворяют в 600-700 см^3 деионизованной воды, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.5. Приготовление 6 N раствора серной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 400 - 500 см^3 деионизованной воды, вносят 336 см^3 концентрированной серной кислоты, перемешивают, доводят водой до метки, вновь перемешивают.

7.6. Приготовление 5%-ного раствора бикарбоната натрия

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 50 г бикарбоната натрия, растворяют в 600-700 см^3 деионизованной воды, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.7. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают 380 см^3 ацетонитрила, 620 см^3 деионизированной воды, 1 см^3 орто-фосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют и дегазируют.

7.8. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.7) при скорости подачи растворителя 0,4 см^3/мин до установления стабильной базовой линии.

7.9. Приготовление градуировочных растворов и растворов внесения

7.9.1. Исходный раствор карфентразона для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,1 г карфентразона (аналитический стандарт в виде кислоты), растворяют в 50-70 см^3 метанола, доводят метанолом до метки, тщательно перемешивают.

В случае использования в качестве аналитического стандартного образца натриевой соли карфентразона, проводят выделение свободной кислоты. С этой целью готовят раствор натриевой соли карфентразона в метаноле с концентрацией карфентразона 2.5 мг/см^3. (0.2825 г образца на 100 см^3 раствора). Аликвоту полученного раствора объемом 1 см^3 помещают в коническую колбу вместимостью 200-250 см^3, вносят 100 см^3 деионизованной воды, перемешивают, с помощью 6 *N* серной кислоты доводят pH раствора до 1-2 (контроль по индикаторной бумаге), переносят его в делительную воронку вместимостью 250 см^3 и проводят экстракцию карфентразона хлористым метиленом (трижды порциями по 50 см^3). Объединенный дихлорметановый экстракт (нижняя фаза) пропускают через слой безводного сульфата натрия, переносят в колбу для упаривания вместимостью 250 см^3, упаривают досуха. Остаток, растворяя порциями ацетонитрила по 6-7 см^3, переносят в мерную колбу вместимостью 25 см^3, доводят ацетонитрилом до метки, перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Растворы № 1-5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора.

7.9.2. Раствор № 1 карфентразона для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10,0 см^3 исходного раствора с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.9.1.), доводят до метки подвижной фазой (приготовленной по п. 7.7), тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

Этот раствор используют для приготовления проб зерна кукурузы, семян рапса и подсолнечника с внесением при оценке полноты извлечения карфентразона из исследуемых образцов, а также контроле качества результатов измерений методом добавок. Для внесения в образцы растительного масла используют раствор с концентрацией 10 мкг/см^3, приготовленный в изопропаноле.

7.9.3. Рабочие растворы №№ 2-5 карфентразона для градуировки (концентрация 0.1 - 1.0 мкг/см^3). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1.0, 2.0, 5.0 и 10.0 см^3 раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.9.2.), доводят до метки подвижной фазой, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2 - 5 с концентрацией карфентразона 0.1, 0.2, 0.5 и 1.0 мкг/см^3, соответственно.

Растворы хранятся в холодильнике в течение месяца.

7.10. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации карфентразона в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки №№ 2 - 5.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

7.11. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 8-10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в

15-20 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1,5 см. После этого колонка готова к работе.

7.12. Проверка хроматографического поведения карфентразона на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора карфентразона с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.9.2.), растворитель упаривают досуха, добавляют 3 см^3 этилацетата, помещают на ультразвуковую баню на 30 сек, вносят 2 см^3 гексана, перемешивают, вновь помещают на ультразвуковую баню на 30 сек и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.11. Промывают колонку последовательно 50 см^3 гексана, 25 см^3 смеси гексан- этилацетат (1:1, по объему) и 50 см^3 этилацетата, элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 70 см^3 2%-ного раствора уксусной кислоты в этилацетате (п. 7.3.) со скоростью 1-2 капли в сек. Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 1 см^3 подвижной фазы, анализируют содержание карфентразона по п. 9.4.

Фракции, содержащие карфентразон, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

ПРИМЕЧАНИЕ: Проверку хроматографического поведения карфентразона следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

8. Отбор проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТами 13586.3-83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», 10583-76 «Рапс. Требования при заготовках и поставках», 22391-89 «Подсолнечник. Требования при заготовках и поставках», 10852-86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051 - 79 от 21.08.79 г).

Отобранные пробы зерна кукурузы, семян рапса и подсолнечника хранят в упаковке из хлопчатобумажной ткани не более 3-х месяцев. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре -18^0С.

Пробы масла (помещенные в стеклянные флаконы) хранят в холодильнике в течение 3-х месяцев.

Перед анализом образцы зерна и семян измельчают.

9. Выполнение определения

9.1. Зерно кукурузы

9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна кукурузы массой 20 г помещают в коническую колбу вместимостью 250 см^3, вносят 100 см^3 смеси ацетонитрил-вода-уксусная кислота (90:10:1, по объему) и помещают на встряхиватель на 1 час.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре дважды промывают смесью ацетонитрил-вода-уксусная кислота (90:10:1, по объему) порциями по 30 см^3. Объединенные экстракт и промывки переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3 и проводят очистку по п. 9.1.2.

9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К экстракту, полученному по п. 9.1.1, помещенному в делительную воронку, добавляют 20 см^3 0,1 *N* раствора гидроксида калия, перемешивают и оставляют на 30 мин. Затем в делительную воронку вносят 50 см^3 гексана, интенсивно ее встряхивают в течение 2-х мин. После полного разделения фаз верхний гексановый слой отделяют и отбрасывают. Операцию промывки щелочного раствора повторяют новой порцией гексана объемом 30 см^3.

Нижний водный слой помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см^3, подкисляют с помощью 6 N раствора серной кислоты до pH 2-3 (контролируя его значение по универсальной индикаторной бумаге), упаривают до водного остатка (объем 30- 40 см^3) при температуре 40^0С, переносят его в делительную воронку вместимостью

250 см^3, вносят 100 см^3 деионизованной воды (предварительно ополоснув ею колбу), 10 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают. Затем вносят в воронку 50 см^3 хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2-х мин. После полного разделения фаз нижний органический слой отделяют, переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3.

Операцию экстракции водной фазы повторяют еще дважды, используя по 30 см^3 хлористого метилена.

Объединенный дихлорметановый экстракт переносят в колбу для упаривания, пропуская через слой (1.5-2 см) безводного сульфата натрия, помещенного в конусную химическую воронку на бумажном фильтре. Упаривают досуха и очищают на колонке с силикагелем по п. 9.1.3.

9.1.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Остаток, полученный по п. 9.1.2, 9.2.2 и 9.2.3., находящийся в круглодонной колбе, растворяют в 3-х см^3 этилацетата, помещая на ультразвуковую баню на 30 сек, добавляют 2 см^3 гексана, перемешивают, вновь помещают на ультразвуковую баню на 30 сек. Затем раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.11. Колбу обмывают трижды порциями гексана по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Промывают колонку последовательно 50 см^3 гексана, 25 см^3 смеси гексан-этилацетат (1:1, по объему) и 50 см^3 этилацетата, элюат отбрасывают.

Карфентразон элюируют с колонки 50 см^3 2%-ного уксусной кислоты в этилацетате со скоростью 1-2 капли в сек, собирая элюат в круглодонную колбу. Раствор упаривают досуха при температуре не выше 35^{0}С, для полного удаления следов уксусной кислоты в колбу вносят 4-5 см^3 гексана и вновь упаривают. Остаток в колбе растворяют в 2-х см^3 подвижной фазы и анализируют содержание карфентразона по п. 9.4.

9.2. Семена рапса, подсолнечника

9.2.1. Экстракция

Образец измельченных семян рапса и подсолнечника массой 20 г помещают в коническую колбу вместимостью 250 см^3, вносят 100 см^3

смеси ацетонитрил-вода-уксусная кислота (90:10:1, по объему) и помещают на встряхиватель на 1 час.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через двойной бумажный фильтр «красная лента» под вакуумом. Осадок на фильтре дважды промывают смесью ацетонитрил-вода-уксусная кислота (90:10:1, по объему) порциями по 30 см^3. Объединенные экстракт и промывки переносят в делительную воронку вместимостью 500 см^3 и проводят очистку по п. 9.2.2.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К экстракту, полученному по п. 9.2.1, помещенному в делительную воронку, добавляют 20 см^3 0,1 N раствора гидроксида калия, перемешивают и оставляют на 30 мин. Затем в делительную воронку вносят 50 см^3 гексана, интенсивно ее встряхивают в течение 2-х мин. После полного разделения фаз верхний гексановый слой отделяют и отбрасывают. Операцию промывки щелочного раствора повторяют новой порцией гексана объемом 30 см^3.

Нижний водный слой помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см^3, подкисляют с помощью 6 N раствора серной кислоты до pH 2-3 (контролируя его значение по универсальной индикаторной бумаге), упаривают до водного остатка (объем 30- 40 см^3) при температуре 40^{0}С, переносят его в делительную воронку вместимостью 250 см^3, вносят 100 см^3 деионизованной воды (предварительно ополоснув ею колбу), 10 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают. Затем вносят в воронку 50 см^3 хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2-х мин. После полного разделения фаз нижний органический слой отделяют, переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3.

Операцию экстракции водной фазы повторяют еще дважды, используя по 30 см^3 хлористого метилена.

Объединенную органическую фазу переносят в новую делительную воронку вместимостью 250 см^3, вносят 25 см^3 5%-ного раствора бикарбоната натрия, интенсивно встряхивают делительную воронку в течение 2-х мин. Для облегчения расслаивания образовавшейся эмульсии (в частности при анализе проб подсолнечника) воронку помещают в морозильную камеру на 15 мин (или холодильник на 1 час). Допустимо перед помещением пробы в холодильник перелить раствор в кони-

ческую колбу с пришлифованной пробкой. После полного разделения фаз верхний водный слой отделяют, перенося в коническую колбу вместимостью 250 см^3.

Операцию экстракции дихлорметанового раствора повторяют, используя 25 см^3 5%-ного раствора бикарбоната натрия. Для облегчения расслаивания фаз воронку (или коблу) снова помещают в холодильник или морозильную камеру.

Водные фазы объединяют в стакане, фракцию хлористого метилена отбрасывают.

Водный раствор переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3, вносят в воронку 25 см^3 гексана, интенсивно встряхивают в течение 1 мин. После полного разделения фаз верхний органический слой отделяют и отбрасывают. Операцию промывки водной фазы повторяют новой порцией гексана объемом 25 см^3.

Водный слой переносят в делительную воронку вместимостью 250 см^3, подкисляют с помощью 6 н раствора серной кислоты до pH 1-2 (контролируя его значение по универсальной индикаторной бумаге), вносят в воронку 50 см^3 хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2-х мин. После полного разделения фаз нижний органический слой отделяют, переносят в круглодонную колбу вместимостью 150 см^3, фильтруя через слой (1.5 – 2 см) безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в химической воронке.

Операцию экстракции водной фазы повторяют, используя 25 см^3 хлористого метилена.

Объединенный в круглодонной колбе экстракт, пропущенный через слой сульфата натрия, упаривают досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке по п. 9.1.3.

9.3. Масло

9.3.1. Экстракция

Образец масла массой 20 г помещают в коническую колбу вместимостью 200 – 250 см^3, растворяют в 25 см^3 гексана, вносят 100 см^3 смеси ацетонитрил-вода-уксусная кислота (90:10:1, по объему) и интенсивно встряхивают в течение 2-х мин.

Для облегчения расслаивания образовавшейся эмульсии колбу помещают в морозильную камеру на 15 мин (или холодильник на 1 час). Смесь осторожно переливают в делительную воронку, после

полного разделения фаз нижний водно-ацетонитрильный слой отделяют, перенося в новую делительную воронку вместимостью 250 см^3 , и подвергают очистке по п. 9.2.2. Гексановый раствор отбрасывают.

9.3.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К экстракту, полученному по п. 9.3.1, помещенному в делительную воронку, добавляют 15 см^3 0,1 N раствора гидроксида калия, перемешивают и оставляют на 30 мин. Затем в делительную воронку вносят 50 см^3 гексана, интенсивно ее встряхивают в течение 2-х мин. После полного разделения фаз нижний водно-ацетонитрильный слой отделяют, перенося в коническую колбу. Верхний гексановый слой отбрасывают.

Ацетонитрильную фазу вновь переносят в делительную воронку и повторяют операцию промывки еще дважды, используя по 25 см^3 гексана.

Нижний водно-ацетонитрильный слой помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3, подкисляют с помощью 6 N раствора серной кислоты до pH 2-3 (контролируя его значение по универсальной индикаторной бумаге), упаривают до водного остатка (объем 30-40 см^3) при температуре 40^{0}С, переносят его в делительную воронку вместимостью 250 см^3, вносят 100 см^3 деионизованной воды (предварительно ополоснув ею колбу), 10 см^3 насыщенного раствора хлористого натрия, перемешивают. Затем вносят в воронку 50 см^3 хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2-х мин.

После полного разделения фаз нижний органический слой отделяют, переносят в круглодонную колбу вместимостью 250 см^3, фильтруя через слой (1.5 – 2 см) безводного сульфата натрия, помещенный на бумажном фильтре в химической воронке.

Операцию экстракции водной фазы повторяют еще дважды, используя 20 см^3 хлористого метилена.

Объединенный в круглодонной колбе экстракт, пропущенный через слой сульфата натрия, упаривают досуха и подвергают дополнительной очистке на колонке по п. 9.1.3.

9.4. Условия хроматографирования

Измерения выполняют при следующих режимных параметрах:

Жидкостный хроматограф «Perkin Elmer» с ультрафиолетовым детектором

Колонка стальная, длиной 25 см, внутренним диаметром 2,0 мм, содержащая Сферисорб S 5 ODS 2, зернением 5 мкм

Температура колонки: комнатная

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода-орто-фосфорная кислота (380:620:1, по объему)

Скорость потока элюента: 0,4 $см^3$/мин

Рабочая длина волны: 244 нм

Чувствительность: 0,005 ед. абсорбции на шкалу

Объем вводимой пробы: 20 $мм^3$

Ориентировочное время выхода карфентразона: 9.5-9.9 мин.

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочный раствор карфентразона с концентрацией 1 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ (подготовленной по п. 7.7.).

10. Обработка результатов анализа

Содержание карфентразон-этила в пробе (X, мг/кг) по основному метаболиту карфентразону рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times V \times K}{m}, \text{ где}$$

A - концентрация карфентразона, найденная по градуировочному графику в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/$см^3$;

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

m - масса анализируемого образца, г;

K- коэффициент пересчета содержания карфентразона на карфентразон-этил, равный 1,07 (по соотношению молекулярных масс);

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

$$\frac{2\cdot|X_1 - X_2|\cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r \qquad (1)$$

где X_1, X_2- результаты параллельных определений, мг/кг;

r- значение предела повторяемости (таблица 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:

$$(\overline{X} \pm \Delta)$$ мг/кг при вероятности P= 0.95,

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

Δ- граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$$\Delta = \delta * X / 100,$$

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

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

*«содержание карфентразон-этила 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 $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д \geq \Delta_{л,\overline{X}} + \Delta_{л,\overline{X'}},$$

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

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta,$$

где Δ- граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$$\Delta = \delta * X / 100,$$

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

Контрольный параметр процедуры $К_к$ рассчитывают по формуле:

$$К_к = \overline{X'} - \overline{X} - C_д,$$

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

Норматив контроля К рассчитывают по формуле

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

Проводят сопоставление результата контроля процедуры ($К_к$) с нормативом контроля (К).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|К_к| \leq К, \qquad (2)$$

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)

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

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

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

gost.e-ecolog.ru