Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств клотианидина в воде, почве, ботве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2331-08

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 клотианидина в воде, почве, ботве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2331–08

ББК 51.21
О-60

О-60 **Определение** остаточных количеств клотианидина в воде, почве, ботве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 12 с.

1. Разработаны: Всероссийским НИИ защиты растений (В.И. Довженко, И.А. Цибульская, И.К. Журкович, Н.В. Луговкина, Н.Г. Ковров).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по защите прав потребителей и благополучия человека (протокол от 6 декабря 2007 г. № 3).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 15 февраля 2008 г.

4. Введены в действие с 10 апреля 2008 г.

5. Введены впервые в качестве дополнения.

ББК 51.21

Формат 60x88/16 **Печ. л. 0,75.**

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
15 февраля 2008 г.
Дата введения: 10 апреля 2008 г.

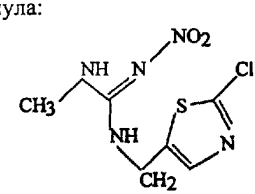
4.1. Методы контроля. Химические факторы

Определение остаточных количеств клотианидина в воде, почве, ботве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2331–08

1. Вводная часть

Действующее вещество: клотианидин.
Структурная формула:



(E)-1-(2-хлор-1,3-тиазол-5-илметил)-3-метил -2-нитрогуанидин (IUPAC).

Мол. масса: 249.7.

Брутто формула: $C_6H_8ClN_5O_2S$.

Клотианидин представляет собой порошок без цвета и запаха. Температура плавления 176.8°C. Давление пара – $1.3x10^{-4}$ мПа (25°C). Коэффициент распределения в системе н-октанол - вода K_{ow} lgP = 0.7 (25°C). pKa = 11.09 (20^0C).

Растворимость в воде (20^0C) – 0.304 (pH 4), 0.34 (pH 10) г/$дм^3$. Растворимость в гептане < 0.00104, в ксилоле 0.028, дихлорметане 1.32, метаноле 6.26, октаноле 0.938, ацетоне 15.2, этилацетате 2.03 г/л (25^0C).

Краткая токсикологическая характеристика. Острая оральная токсичность для крыс LD_{50} >5000 мг/кг, ингаляционная токсичность для крыс LC_{50} (4 ч) >6.1 мг/л. Не мутаген, не онкоген для крыс и мышей, не тератоген для крыс и кроликов. При прямом контакте опасен для пчел, не опасен при использовании в качестве протравителя и в случае обработок не непосредственно на цветущие культуры.

Область применения: инсектицид из группы неоникотиноидов для борьбы с сосущими и грызущими насекомыми на рисе, кукурузе, рапсе, овощных и фруктовых культурах. Используется для протравливания семян, обработки почвы и вегетирующей культуры.

Гигиенические нормативы для клотианидина в России не установлены.

2. Методика определения клотианидина в воде, почве, ботве и клубнях картофеля методом ВЭЖХ

2.1. Основные положения

2.1.1. Область применения и принцип метода

Настоящий документ устанавливает методику определения остаточных количеств клотианидина в воде водоемов в диапазоне концентраций 0.001-0.01 мг/кг, в почве – 0.05-0.5 мг/кг, в клубнях картофеля – 0.01-0.1 мг/кг и в ботве картофеля – 0.02-0.2 мг/кг.

Методика основана на определении клотианидина методом ВЭЖХ с использованием УФ-детектора после его извлечения из образцов ацетоном (ботва и клубни картофеля) или водно-ацетоновой смесью (почва) с последующей очисткой методом твердофазной экстракции.

2.1.2. Метрологические характеристики

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 таблице 1, для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 1

Метрологические параметры

Объект анализа	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ, %	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Вода	0.001 – 0.01	100	4.2	11.8	16.5
Почва	0.05 – 0.1	50	5.0	14.0	19.6
Почва	0.1 – 0.5	25	4.8	13.4	18.7

Ботва	0.02 – 0.1	50	5.4	15.1	21.1
Ботва	0.1 – 0.2	25	5.0	14.0	19.6
Клубни	0.01 – 0.1	50	5.9	16.5	23.1

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

Таблица 2

Полнота извлечения клотианидина, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для n = 20, P = 0.95

Анализируемый объект	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Вода	0.001	0.001-0.01	87.4	4.8	4.4
Почва	0.05	0.05-0.5	96.5	5.2	4.7
Ботва	0.02	0.02-0.2	81.1	5.6	5.1
Клубни	0.01	0.01-0.1	85.7	6.3	5.7

2.1.3. Избирательность метода

Избирательность метода определения клотианидина достигается условиями подготовки проб и хроматографического анализа.

2.2. Реактивы и материалы

Ацетон, осч, ТУ 6-09-3513-86.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, «Криохром», сорт 1 или х.ч., ТУ 6-09-3534-87.

Бумажные фильтры «красная лента», ТУ 6.091678-86.

Вода бидистиллированная или деионизированная, ГОСТ 6709-79.

Клотианидин, аналитический стандарт с содержанием д.в. 99,9%.

Кислота трифторуксусная, ч, ТУ 6-09-3877-80, свежеперегнанная; 0.05 % водный раствор.

Метанол, хч, ГОСТ 6995-77.

Этилацетат, хч, ГОСТ 22300-76с изм. № 1,2,3.

Подвижная фаза для ВЭЖХ: смесь ацетонитрила и 0,05М % трифторуксусной кислоты (30:70 или 20:80, по объему).

Патроны для твердофазной экстракции Диапак С16 («БиоХимМак СТ»).

Концентрирующие патроны, заполненные силикагелем 60 (0.040–0.063 mm), Merck.

2.3. Приборы и посуда

Жидкостный хроматограф «ACQUITY» фирмы «Waters» с быстросканирующим УФ-детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки или «Breeze» фирмы «Waters» или аналогичный.

Аналитические колонки ACQUITY UPLC BEH C18 (100x2.1) мм, 1,7 мкм (Waters) и

ACQUITY UPLC BEH Phenyl (100x2.1) мм, 1,7 мкм (Waters) или Spherisorb ODS2 (2.1 x 150) мм, 3 мкм (Waters).

Баня ультразвуковая «Серьга», ТУ 3.836.008 или аналогичная.

Весы аналитические ВЛА-200, ГОСТ 24104-2001 или аналогичные.

Воронка Бюхнера, ГОСТ 0147.

Ротационный испаритель вакуумный ИР-1М, ТУ 25-11-917-74, Buchi R-205 или аналогичный.

Насос водоструйный, ГОСТ 10696–75.

Испаритель одноканальный "ПЭ-2300" для концентрирования экстрактов в токе азота.

Центрифуга ОПн-8УХЛ4.2, ТУ 5.375-4261-76.

Бидистиллятор.

Аллонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами).

Шприц медицинский с разъемом Льюера, ГОСТ 22090.

РН-метр универсальный ЭВ-74, ГОСТ 22261-76.

Колбы плоскодонные на шлифах КШ500 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.

Колбы круглодонные на шлифах КШ50 29/32 ТС, ГОСТ 10384-72.

Воронки лабораторные В-75-110, ГОСТ 25 336-82.

Цилиндры мерные на 100, 250 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1774-74.

Колбы мерные на 25, 50, 100 и 1000 $см^3$, ГОСТ 1770-74.

Пипетки на 1, 2, 5, 10 $см^3$, ГОСТ 22292-74.

Микродозаторы Ленпипет переменного объема от 200 до 1000 $мм^3$ и от 1 до 5 $см^3$.

Сито с диаметром ячеек 1 мм.

2.4. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ 26832-86 «Картофель свежий для переработки на продукты питания»; ГОСТ 28168-89 «Почвы. Отбор проб»; ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб». Для длительного хранения пробы почвы подсушиваются при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в течение года. Перед ана-

лизом сухую почву доводят до стандартной влажности и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Пробы клубней и ботвы картофеля для определения остаточных количеств пестицидов хранят в морозильной камере при температуре -18^{0}С.

2.5. Подготовка к определению

2.5.1. Подготовка и очистка реактивов и растворителей

Перед началом работы рекомендуется проверить чистоту применяемых органических растворителей. Для этого 100 мл растворителя упаривают в ротационном вакуумном испарителе при температуре 40^{0}С до объема 1,0 см^3 и хроматографируют. При обнаружении мешающих определению примесей очистку растворителей производят в соответствии с общепринятыми методиками.

2.5.2. Кондиционирование колонки

Перед началом анализа аналитические колонки кондиционируют в потоке подвижной фазы (0.1 — 0.2 см^3/мин) до стабилизации нулевой линии в течение 1–2 часов.

2.5.3. Приготовление растворов

Для приготовления 0.05 % раствора трифторуксусной кислоты 0.5 см^3 свежеперегнанной кислоты помещают в мерную колбу объемом 1 дм^3, доводят объем до метки бидистиллированной или деионизованной водой и перемешивают.

Приготовление стандартного и градуировочных растворов:

Берут точную навеску клотианидина (50 мг), переносят в мерную колбу на 100 см^3, растворяют навеску в ацетонитриле и доводят до метки. (Стандартный раствор с концентрацией 0.5 мг/ см^3). Градуировочные растворы с концентрациями 0.1, 0.2, 0.5, 0.75 и 1.0 мкг/см^3 готовят методом последовательного разбавления по объему, используя раствор подвижной фазы – смесь ацетонитрила и 0.05 % трифторуксусной кислоты (20:80, по объему). При изучении полноты извлечения клотианидина используют ацетонитрильные растворы вещества.

Стандартный раствор можно хранить в холодильнике в силанизированном или тефлоновом флаконе при температуре 0–4^{0}С в течение 1 месяца, градуировочные растворы используют в течение рабочего дня.

2.5.4. Построение градуировочного графика

Для построения градуировочного графика (площадь пика – концентрация клотианидина в растворе) в хроматограф вводят по 10 мм^3 градуировочных растворов (не менее 3-х параллельных измерений для ка-

ждой концентрации, не менее 4-х точек по диапазону измеряемых концентраций). Затем измеряют площади пиков и строят график зависимости среднего значения площади пика от концентрации клотианидина в градуировочном растворе.

2.5.5. Подготовка приборов и средств измерения

Установка и подготовка всех приборов и средств измерения проводится в соответствии с требованиями технической документации.

2.5.6. Подготовка концентрирующих патронов для очистки экстракта

2.5.6.1. Кондиционирование патрона, заполненного гексадецилсиликагелем – Диапак С16, осуществляют, пропуская через патрон последовательно по 2 мл метанола и воды. Элюат отбрасывают.

2.5.6.2. Кондиционирование патрона для дополнительной очистки экстрактов клубней и ботвы, заполненного Силикагелем 60 (0.5 г), осуществляют пропусканием 2 мл этилацетата.

2.6. Проведение определения

2.6.1. Определение клотианидина в пробах воды

Образец предварительно отфильтрованной воды объемом 25 $см^3$ пропускают через кондиционированный концентрирующий патрон, заполненный гексадецилсиликагелем. Фильтрат отбрасывают. Клотианидин элюируют 5 $см^3$ ацетона. Элюат выпаривают досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40^0С и сухой остаток растворяют в 0.25 $см^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ. 10 $мм^3$ раствора вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.2. Определение клотианидина в пробах почвы

Образец почвы массой 10 г, предварительно просеянной через сито, помещают в коническую колбу емкостью 100 $см^3$ с притертой пробкой, прибавляют 10 $см^3$ воды и 40 $см^3$ ацетона. Колбу помещают в ультразвуковую баню и экстрагируют клотианидин в течение 15 мин. Суспензию фильтруют в вакууме через воронку Бюхнера (фильтр «красная лента»), осадок на фильтре промывают 5 $см^3$ ацетона. Экстракцию повторяют, используя в качестве экстрагента 50 $см^3$ смеси ацетон — вода (4:1). Фильтрат упаривают на ротационном испарителе (40^0С) до водного остатка. Водный остаток пропускают через подготовленный по п.2.5.6. патрон с октадецилсиликагелем. Фильтрат отбрасывают. Колбу ополаскивают дважды порциями по 3 мл ацетонитрила и смывы также пропускают через тот же патрон. Фильтрат отбрасывают. Клотианидин элюируют 5 $см^3$ ацетона. Элюат собирают, выпаривают

досуха на ротационном испарителе (40^{0}С) и сухой остаток растворяют в 5 см^3 подвижной фазы. 10 мм^3 вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.3. Определение клотианидина в пробах клубне и ботвы картофеля

Навеску измельченных клубней или нарезанной ботвы картофеля массой 20 г помещают в коническую колбу емкостью 100 см^3. Прибавляют 50 см^3 ацетона и экстрагируют клотианидин на ультразвуковой бане в течение 15 мин. Суспензию фильтруют в вакууме через воронку Бюхнера с фильтром «красная лента». Экстракцию повторяют с 50 см^3 ацетона, выдерживая в ультразвуковой ванне в течение 15 мин, суспензию фильтруют. Объединенный экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре бани не выше 40°С до полного удаления ацетона. Дальнейшую очистку проводят на патроне Диапак С16. Водный остаток пропускают через откондиционированный по п. 2.5.6. патрон, ополаскивают колбу 2 см^3 воды и тоже пропускают через патрон. Объединенный фильтрат отбрасывают. Клотианидин элюируют 5 см^3 ацетона в чистую круглодонную колбу объемом 10 см^3 и отдувают ацетон в токе азота. Сухой остаток растворяют в 1 см^3 этилацетата и выдерживают колбу в ультразвуковой бане в течение 5 мин. Экстракт для дополнительной очистки вносят в подготовленный концентрирующий патрон, заполненный силикагелем 60. Патрон промывают 2 см^3 этилацетата. Фильтрат и промывку отбрасывают. Клотианидин элюируют 1 см^3 ацетона. Ацетон удаляют из элюата током азота (с помощью испарителя одноканального). Сухой остаток при анализе клубней растворяют в 2 см^3, а ботвы — в 4 см^3 подвижной фазы и 10 мм^3 вводят в жидкостный хроматограф.

2.6.4. Условия хроматографирования

Ультраэффективный жидкостный хроматограф «ACQUITY» фирмы Waters с быстро-сканирующим УФ детектором, снабженный дегазатором, автоматическим пробоотборником и термостатом колонки. Колонка 1 - ACQUITY UPLC BEH C18 (100x2.1) мм, 1,7 мкм (Waters) при анализе воды. Колонка 2 - ACQUITY UPLC BEH Phenyl (100x2.1) мм, 1,7 мкм (Waters) при анализе проб почвы, клубней и ботвы картофеля. Температура колонки 30±1°С. Подвижная фаза: ацетонитрил – 0.05 % трифторуксусная кислота в соотношении 30:70 и скорости потока 0,1 см^3/мин (колонка 1) и 20:80 и скорости потока 0.15 см^3/мин (колонка 2). Рабочая длина волны 270 нм. Объем вводимой пробы 10 мкл. Время удерживания клотианидина 4.4 ±0.05 мин (колонка 1) и 5.4±0.1 мин (колонка 2).

Альтернативные условия хроматографирования: жидкостный хроматограф «Breeze» фирмы Waters с УФ-детектором и дегазатором. Ра-

бочая длина волны 270 нм. Аналитическая колонка Spherisorb ODS2 (150 х 2.1) мм, 3 мкм (Waters) для анализа воды, почвы, клубней и ботвы картофеля. Подвижная фаза ацетонитрил – 0.05 % трифторуксусная кислота в соотношении 20:80. Скорость потока элюента 0.2 $см^3$/мин. Дозируемый объем 20 $см^3$.

Время удерживания клотианидина 8.2±0.1 мин.

3. Обработка результатов анализа

Содержание клотианидина в образцах воды, почвы, клубней и ботвы картофеля (X, мг/кг) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_2 \cdot C \cdot V}{S_1 \cdot P},$$

где S_1- площадь пика клотианидина в стандартном растворе, (мВ·сек);

S_2- площадь пика клотианидина в анализируемой пробе, (мВ·сек);

V - объём пробы, подготовленной для хроматографического анализа, $см^3$;

P - навеска анализируемого образца, г

C - концентрация стандартного раствора клотианидина, мкг/$см^3$.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор клотианидина 1 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

4. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает придела 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 ($r = 2.8\sigma_r$).

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

5. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных

приемлемыми, мг/кг;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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

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

«содержание вещества в пробе «менее нижней границы определения» (например: менее 0.005 мг/кг*, где *-0.005 мг/кг – предел обнаружения).

6. 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».

6.1. Стабильность результатов измерений контролируют перед проведением измерений, анализируя один из градуировочных растворов.

6.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится с применением метода добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

где $\pm \Delta_{л,X}$ ($\pm \Delta_{л,X}'$) – 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:

$$\Delta_л = \pm 0.84\,\Delta,$$

где Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = X' - X - C_д,$$

где X', X, $C_д$ - среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п.4) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки, соответственно, мг/кг.

Норматив контроля К рассчитывают по формуле:

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

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

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 к их устранению.

6.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости:

Расхождение между результатами измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

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

7. Требования техники безопасности

При проведении работы необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими, легковоспламеняющимися веществами (ГОСТ 12.1005-88).

При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа и работе с электроустановками соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019-79 и инструкциями по эксплуатации приборов.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91.

8. Требования к квалификации оператора

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист-химик, имеющий опыт работы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, ознакомленный с руководством по эксплуатации жидкостного хроматографа, освоивший данную методику

gost.e-ecolog.ru

ший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п.6.