Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств индоксакарба в воде, почве, яблоках, ягодах винограда, яблочном и виноградном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2284—07

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 индоксакарба в воде, почве, яблоках, ягодах винограда, яблочном и виноградном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2284-07

ББК 51.21
О-60

О-60 **Определение** остаточных количеств индоксакарба в воде, почве, яблоках, ягодах винограда, яблочном и виноградном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 20 с.

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом МСХА им. К.А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (Калинин В.А. - профессор, канд. с-х. наук., Довгилевич Е.В. - ст.н.сотр., канд. биол. наук, Довгилевич А.В. - ст.н.сотр., канд. хим. наук, Устименко Н.В. - ст.н.сотр., канд. биол. наук).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно гигиеническому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 2 от 21.06.2007 г.).

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 октября 2007 г.

4. Введены в действие с 9 декабря 2007 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

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
9 октября 2007 г.

Дата введения: 9 декабря 2007 г.

4.1. Методы контроля. Химические факторы

Определение остаточных количеств индоксакарба в воде, почве, яблоках, ягодах винограда, яблочном и виноградном соках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2284-07

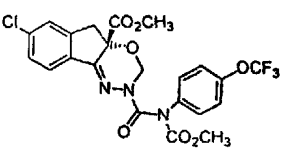
Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации Индоксакарба в диапазоне 0,02 – 0,2 мг/кг в яблоках, ягодах винограда, яблочном и виноградном соке, 0,01 – 0,1 мг/кг в почве и 0,005 – 0,05 мг/дм^3 в воде.

Фирма производитель: Дюпон де Немур Интернешнл С.А.

Торговое название: Авант

Название действующего вещества по ИСО: Индоксакарб.

Название по ИЮПАК: (*S*)-*N*-[7-хлоро-2,3,4а,5-тетрагидро-4а-(метоксикарбонил)индено=[1,2-*e*][1,3,4]оксадиазин-2-илкарбонил]-4'-(трифторметокси)карбанилат



Эмпирическая формула: $C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$.

Молекулярная масса: 527,8.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белого цвета.

Давление насыщенного пара: $2.5 \cdot 10^{-5}$ мПа (25°С)

Коэффициент распределения в системе октанол/вода при 25° С: K_{ow} logP= 4,65.

Температура плавления: 88,1 °С.

Растворимость в воде: 0,2 мг/дм^3. Растворимость в органических растворителях (г/дм^3 при 20°С): ацетон – более 250, ацетонитрил - 139, метанол - 103, н-октанол - 14,5.

Гидролитически стоек в кислой и нейтральной среде с $ДТ_{50}$ более 30 дней (pH 5), 38 дней (pH 7), но быстро разрушается в щелочном растворе ($ДТ_{50}$ -1 день при pH 9).

Индоксакарб средне стоек в почве и мало подвижен.

Краткая токсикологическая характеристика: Индоксакарб относится к опасным веществам по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс 268 мг/кг) и по ингаляционной [$ЛК_{50}$ для крыс - 2000 мг/м^3 воздуха] и к мало опасным веществам по накожной ($ЛД_{50}$ для кроликов > 5000 мг/кг) токсичности. Не вызывает покраснения кожи и глаз у кроликов.

В России гигиенические нормативы не установлены:

Область применения: Индоксакарб - инсектицид из класса оксадиазинов контактного и кишечного действия, блокирует натриевые каналы нервных клеток. Он эффективно подавляет развитие вредителей из отряда Lepidoptera.

Проходит регистрационные испытания в России под торговым названием Авант, КС, 150 г/л в качестве инсектицида для борьбы с вредителями яблоневых садов и виноградников с нормой расхода 0,4 – 0,5 л/га и 5-ю обработками за сезон.

1. Метрологическая характеристика метода

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

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

Таблица 1

Метрологические параметры для Индоксакарба

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, %
Вода	**0,005-0,01**	100	**3,5**	**9,8**	**11,7**
	Более 0,01-0,05	50	4,0	11,2	13,4
Почва	0,01 0,1 вкл	50	5,0	14,0	20,0
Яблоки	0,02-0,1 вкл	50	**5,0**	**14,0**	20,0
	Более 0,1-0,2	25	3,5	9,8	11,7
Яблочный сок	0,02-0,1	50	3,5	9,8	11,7
	0,1-0,2	25	4,0	11,2	13,4
Ягоды винограда	0,02-0,1 вкл	50	4,0	11,2	13,4
	Более 0,1-0,2	25	5,0	14,0	20,0
Виноградный сок	0,02-0,1 вкл.	50	3,5	9,8	11,7
	Более 0,1-0,2	**25**	**4,0**	11,2	13,4

Таблица 2

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

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P – 0,95, n = 20				
	Предел обнаружения, мг/кг (мг/дм^3)	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Вода	0,005	0,005 – 0,05	89,2	**4,4**	1,8
Почва	0,01	0,01 – 0,1	85,8	3,0	1,2
Яблоки	**0,02**	0,02 – 0,2	85,5	**2,9**	**1,2**

Яблочный сок	0,02	0,02 - 0,2	90,8	2,3	1,0
Ягоды винограда	0,02	0,02 0,2	89,2	2,1	0,9
Виноградный сок	0,02	0,02 – 0,2	89,7	2,1	0,9

2. Метод измерений

Метод основан на определении Индоксакарба с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистке перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на концентрирующих патронах на основе силикагеля (Диапак Нитрил и Диапак С16).

Идентификация веществ проводится по времени удерживания, а количественное определение - методом абсолютной калибровки.

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

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений.

Весы аналитические «OHAUS», Σ 11140.

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г «ACCULAB» V600.

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

Микрошприц для жидкостного хроматографа на 50-100 $мм^3$.

Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$, ГОСТ 20292-74.

Хроматограф жидкостной Уотерс 510 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу или другой аналогичного типа, номер госрегистрации 15311-02.

Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$, ГОСТ 1770-74.

Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Индоксакарб, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 99,6% (фирма Дюпон де Немур Интернешнл, С.А)

Ацетон, осч. ТУ 2633-00-4-11291058-94

Ацетонитрил осч., УФ-205 нм, ТУ 6-09-2167-84.

Вода бидистиллированная, деионизированная, ГОСТ 7602-72.

Гексан, х.ч. д/спектроскопии, ТУ 6-09-06-657-84

Калий марганцовокислый, ч.д.а. ГОСТ 20490-75.

Кальций хлористый, х.ч. ГОСТ 4161-76.

Натрий сернокислый, безводный, х.ч. ГОСТ 4166-76.

Натрий хлористый, х.ч. ГОСТ 4233-77.

Эфир диэтиловый, ГОСТ 6265-74

Концентрирующие патроны Диапак Нитрил (0,6 г), ТУ 4215-002-05451931-94

Концентрирующие патроны Диапак С 16 (0,6 г), ТУ 4215-002-05451931-94

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами Диапак С, Диапак Нитрил и Диапак С 16.

Аппарат для встряхивания проб «SKLO UNION TYP LT1».

Банки с крышками для экстракции на 250 мл, полипропилен, кат.№3120-0250, NALGENE.

Ванна ультразвуковая «UNITRA» UNIMA OLSZTYN UM-4.

Воронки химические для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 8613-75.

Воронки делительные на 250 $см^3$, ГОСТ 10054-75.

Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi или ИР-1М, ТУ 25-11-917-74 с

водяной баней;

Колбы конические плоскодонные на 100 и 250 $см^3$, КПШ-100, КПШ-250, ГОСТ 10394-72.

Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP18, зернение 5 мкм, фирма Уотерс.

Колбы конические, плоскодонные объемом 250, 500 и 1000 $см^3$, ГОСТ 9737-70

Концентраторы грушевидные и круглодонные, объемом 100 и 250 $см^3$, ГОСТ 10394-75

Насос диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laboport.

Предколонка хроматографическая стальная, Symmetry C 18, длиной 20 мм, внутренним диаметром 3,9 мм, зернение 5 мкм, фирма Уотерс

Стаканы стеклянные объемом 100-500 $см^3$, ГОСТ 25366-80Е.

Установка для перегонки растворителей

Фильтры бумажные, "красная лента", ТУ-6-09-1678-86.

Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма Уотерс

Центрифуга MPW-350e с набором полипропиленовых банок емкостью 200 мл.

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 жидкостный 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 определений

Выполнению измерений предшествуют следующие операции: очистка растворителей (при необходимости), приготовление растворов, кондиционирование хроматографической колонки, подготовка концентрирующих патронов Диапак С, Диапак С 16 и Диапак Нитрил для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на патронах, построение калибровочной кривой.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1.Очистка ацетона

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия (А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.438-439)

7.1.2. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил перегоняют.

7.1.3. Очистка гексана

Гексан встряхивают с концентрированной серной кислотой, промывают бледно-розовым раствором перманганата калия до тех пор, пока раствор не перестанет обесцвечиваться, затем промывают водой, сушат над безводным хлористым кальцием и перегоняют (А.Гордон, Р.Форд Спутник химика, Москва, 1976 г., с.441).

7.1.4. Очистка бидистиллированной воды

Бидистиллят кипятят в течение 6 часов с марганцовокислым калием, добавленным из расчета 1 г/л и затем перегоняют.

7.1.5. Очистка диэтилового эфира

Диэтиловый эфир перегоняют.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа.

7.2.1. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и очищенную воду.

В плоскодонную колбу объемом 1 дм^3 помещают 700 см^3 ацетонитрила и 300 см^3 очищенной воды. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см^3/мин в течение 5 минут, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 минуту.

7.2.2. Приготовление градуировочных растворов

7.2.2.1.Стандартный раствор с концентрацией Индоксакарба 200,0 мкг/см^3

Взвешивают 10 мг Индоксакарба в мерной колбе объемом 50 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом.

7.2.2.2.Стандартный раствор с концентрацией Индоксакарба 10,0 мкг/см^3

Из стандартного раствора Индоксакарба с концентрацией 200,0 мг/см^3 отбирают пипеткой 5 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом при перемешивании.

7.2.2.3.Стандартные растворы Индоксакарба с концентрацией 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 для построения калибровочной кривой и внесения в растительные образцы, воду и почву

Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 и используют эти растворы для хроматографического исследования.

7.3. Установление градуировочной характеристики

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

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм^3 каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.6. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений (рисунок 1).

7.4. Подготовка концентрирующих патронов Диапак Нитрил и Диапак С 16 для очистки экстрактов

7.4.1. Подготовка концентрирующего патрона Диапак Нитрил для очистки экстракта

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

Патрон Диапак Нитрил устанавливают на аллонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают последовательно 10 $см^3$ смеси гексан- ацетон в соотношении 9:2. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.4.1.1. Проверка хроматографического поведения Индоксакарба на концентрирующем патроне Диапак Нитрил

Из стандартного раствора Индоксакарба в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/ $см^3$ отбирают 1 $см^3$, помещают в круглодонную колбу объемом 100 $см^3$ и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30°С.

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 $см^3$ гексана, смесь перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют. Тот же концентратор обмывают двумя порциями по 10 $см^3$ смеси гексан-ацетон в соотношении 9:2 и последовательно вносят на патрон. Элюаты после прохождения каждой порции собирают в отдельные концентраторы, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Индоксакарб, объединяют их и рассчитывают объем растворителя, необходимого для вымывания вещества из патрона.

7.4.2. Подготовка концентрирующего патрона Диапак-С16 для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин. При работе на патронах Диапак-С16 используют очищенную воду.

Патрон Диапак-С16 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Люер объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 7:3 и 20 $см^3$ воды. Элюат отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона!

7.4.2.1. Проверка хроматографического поведения Индоксакарба на концентрирующем патроне Диапак-С16

Из стандартного раствора Индоксакарба в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/ $см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в круглодонную колбу объемом 100 $см^3$ и добавляют туда 9 $см^3$ воды, перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:4 и вносят на патрон. Элюат выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:2 и вносят на патрон. Элюат выпаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 мл ацетонитрила и хроматографируют.

Исходный концентратор обмывают двумя порциями по 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 7:3 и вносят на патрон. Элюат после прохождения каждой порции упаривают досуха, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют. Определяют фракции, содержащие Индоксакарб, объединяют их и рассчитывают объем растворителя, необходимого для вымывания вещества из патрона.

7.5. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP18 с предколонкой Symmetry C18 устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 25°С и скорости потока подвижной фазы 1 $см^3$/мин 3-4 часа.

8. Отбор проб и хранение

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), а также в соответствии с 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 25896-83 «Виноград свежий столовый. ТУ», ГОСТ 25892-83Е «Сок виноградный натуральный. ТУ», ГОСТ 27572-87 «Яблоки свежие для промышленной переработки. ТУ», ГОСТ 656-79 «Соки плодовые и ягодные натуральные».

Пробы воды и соков хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре +4°С не более 10 суток. Пробы винограда и яблок хранят в холодильнике в полиэтиленовых пакетах при температуре 0-4 ^{0}С не более суток. Для длительного хранения пробы яблок и винограда замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильнике при температуре -18 ^{O}С до 2-х лет.

Пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

9. Проведение определений

9.1.Вода

9.1.1.Экстракция

Пробу воды объемом 100 см^{3}помещают в делительную воронку объемом 250 см^3, прибавляют 5 г сухого хлорида натрия и интенсивно встряхивают до полного растворения соли.

Затем в ту же делительную воронку помещают 30 мл гексана и интенсивно встряхивают 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в химический стакан объемом 150 см^3, верхний гексановый слой собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия. Водную фазу возвращают в делительную воронку и экстрагируют Индоксакарб еще двумя порциями гексана объемом по 30 см^3 в тех же условиях. Гексановый экстракт объединяют в концентраторе объемом 250 см^3, собирая его через слой безводного сульфата натрия. Осушитель затем обмывают 10 см^3 гексана, смыв объединяют с основным экстрактом и экстракт выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С. Сухой экстракт очищают на концентрирующих патронах Диапак С16.

9.1.2. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С 16

Сухой остаток, полученный по 9.1.1. растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 $см^3$ воды, смесь перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:4 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 1:2 и вносят на патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 7:3 и вносят на патрон. Элюат собирают в чистый концентратор и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С. Сухой остаток растворяют в 2-5 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция

Образец почвы массой 20 г помещают в центрифужный флакон объемом 200 $см^3$, прибавляют 50 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 9:1 и помещают в ультразвуковую ванну на 5 минут. Затем банку встряхивают 5 минут на механическом встряхивателе при комнатной температуре, и содержимое банки центрифугируют 4 минуты при скорости 4000 об/мин. Супернатант фильтруют через фильтр "красная лента" в колбу объемом 250 мл с 5 г сухого хлорида натрия.

К остатку в центрифужном флаконе прибавляют 50 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода в соотношении 9:1, перемешивают содержимое флакона до гомогенного состояния стеклянной палочкой и повторяют экстракцию в ранее описанных условиях. Супернатанты объединяют в коническую колбе с хлоридом натрия, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10 минут. Затем содержимое колбы (без не растворившейся соли) переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$ и выдерживают 5 минут. Выделившуюся нижнюю водную фазу отбрасывают, а верхнюю ацетонитрильную собирают в концентратор объемом 250 $см^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха при температуре не выше 30°С.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К сухому остатку в концентраторе, полученному по п. 9.2.1., прибавляют 3 $см^3$ ацетона и обмывают стенки колбы. Туда же прибавляют

100 мл дистиллированной воды , 5 г сухого хлорида натрия и перемешивают до полного растворения соли. Затем содержимое концентратора переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$, прибавляют туда 30 $см^3$ гексана и встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний водный слой помещают в химический стакан объемом 150 $см^3$, а верхний гексановый слой собирают в в концентратор объемом 250 $см^3$ через слой безводного сульфата натрия. Водный слой возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию двумя порциями гексана объемом по 30 $см^3$. Гексановые фракции объединяют в концентраторе, осушитель обмывают 10 $см^3$ гексана, объединяют с основным экстрактом и выпаривают досуха при температуре не выше 30°С. Водную фазу отбрасывают. Сухой остаток растворяют в 2 мл ацетона и очищают на концентрирующих патронах Диапак Нитрил.

9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Нитрил и Диапак С 16

Сухой остаток, полученный по п.9.2.2. растворяют в 2 $см^3$ ацетона, обмывая стенки концентратора. Затем в концентратор добавляют 9 $см^3$ гексана, смесь перемешивают и полученный раствор вносят на патрон. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси гексан-ацетон в соотношении 9:2 и также вносят на патрон. Элюаты собирают, объединяют, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30°С, растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила и подвергают дальнейшей очистке на патронах Диапак С16, как указано в п.*9.1.2.* После очистки элюат выпаривают досуха, растворяют в 2 $см^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

9.3. Яблоки

9.3.1. Экстракция

Образец измельченных плодов яблок массой 10 г помещают помещают в коническую колбу объемом 250 $см^3$, прибавляют 50 $см^3$ ацетонитрила и помещают в ультразвуковую ванну на 5 минут. Затем экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ с 5 г сухого хлорида натрия Экстракцию повторяют еще два раза в тех же условиях, используя по 50 $см^3$ ацетонитрила. Экстракты объединяют в конической колбе с хлоридом натрия, перемешивают и выдерживают при комнатной температуре 10 минут. Затем содержимое колбы (без не растворившейся

соли) переносят в делительную воронку объемом 250 см^3 и выдерживают 5 минут. Выделившуюся нижнюю водную фазу отбрасывают, а верхнюю ацетонитрильную собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха при температуре не выше 30°С.

9.3.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К сухому остатку в концентраторе, полученному по п. 9.3.1., прибавляют 3 см^3 ацетона и обмывают стенки колбы . Туда же прибавляют 100 мл дистиллированной воды, 5 г сухого хлорида натрия и перемешивают до полного растворения соли. Затем содержимое концентратора переносят в делительную воронку объемом 250 см^3, прибавляют туда 30 см^3 диэтилового эфира и встряхивают делительную воронку 2 минуты. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (эфир) с эмульсией собирают в концентратор объемом 250 см^3. Водный слой возвращают в делительную воронку. Экстракцию повторяют двумя порциями диэтилового эфира объемом по 30 см^3 в тех же условиях. Объединенный эфирный экстракт упаривают досуха при температуре не выше 30°С.

9.3.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Нитрил и Диапак С 16

Очистку экстракта проводят по п. 9.2.3.

9.4. Ягоды винограда

Экстракцию, очистку экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей и на концентрирующих патронах Диапак Нитрил и Диапак С 16 проводят так же, как описано в пп. *9.3.1, 9.3.2 и 9.3.3.(яблоки).*

9.5. Яблочный и виноградный соки

9.5.1. Экстракция

Образец виноградного сока объемом 10 см^3 помещают в делительную воронку объемом 250 см^3. Туда же прибавляют 5 г сухого хлорида натрия, 100 см^3 дистиллированной воды и перемешивают до полного растворения соли. Индоксакарб экстрагируют 30 см^3 диэтилового эфира, встряхивая каждый раз делительную воронку 2 минуты. После пол-

ного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (эфир) с эмульсией собирают в химический стакан обьемом 150 см^3. Водный слой возвращают в делительную воронку. Экстракцию повторяют двумя порциями диэтилового эфира объемом по 30 см^3 в тех же условиях. Эфирный экстракт с эмульсией объединяют в химическом стакане объемом 150 см^3.

9.5.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Эфирный экстракт возвращают в делительную воронку, прибавляют туда же 100 мл дистиллированной воды и интенсивно встряхивают 2 минуты. После полного разделения фаз нижний водный слой отбрасывают. а верхний эфирный слой собирают в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия, осушитель обмывают 10 см^3 эфира, объединяют с основным экстрактом и и упаривают досуха при температуре не выше 30°С. Сухой остаток растворяют в 2 мл ацетона и очищают на концентрирующих патронах Диапак Нитрил и Диапак С 16.

9.5.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Нитрил и Диапак С 16

Очистку экстракта на концентрирующих патронах Диапак Нитрил и Диапак С 16 проводят так же, как описано в пп. *9.3.1, 9.3.2 и 9.3.3.(яблоки).*

9.6. Условия хроматографирования

Хроматограф "Waters" или другой с аналогичными характеристиками с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны.

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 4,6 мм х 25 см, зернением 5 мкм.

Предколонка стальная Symmetry C18, 3,9 мм х 2 см, зернением 5 мкм

Температура колонки: 25°С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – вода в соотношении 70:30

Длина волны 300 нм

Время удерживания Индоксакарба - 9,07- 9,44 мин.

Чувствительность 0,005 ед. оптической плотности на шкалу.

Объем вводимой пробы 20 мм^3.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2-20 нг

10. Обработка результатов

Для обработки результатов хроматографического анализа используется программное обеспечение химического анализа Millenium 3.05.01.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание Индоксакарба рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{Sпр \cdot A \cdot V}{100 \cdot Sст \cdot m} \times P$$

где X - содержание Индоксакарба в пробе, мг/кг или мг/дм^3;

Sст - высота (площадь) пика стандарта, мм;

Sпр - высота (площадь) пика образца, мм;

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

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

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

P - содержание Индоксакарба в аналитическом стандарте, %.

11. Контроль погрешности измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ ИСО 5725–1-6. 2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

12. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

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

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.

13. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ - граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$\Delta = \delta * \bar{X}/100$,

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

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

*«содержание вещества в пробе менее 0,01мг/кг»**

** - 0.01 мг/кг - предел обнаружения.*

14. 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:

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

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

$\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta$,

где Δ - граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$\Delta = \delta * \bar{X}/100$,

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

Результат контроля процедуры $К_к$ рассчитывают по формуле:

$К_к = \bar{X}' - \bar{X} - C_д$.

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

Норматив контроля К рассчитывают по формуле:

$$K = \sqrt{\Delta^2_{\bar{x}'} + \Delta^2_{\bar{x}}}$$

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 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)

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

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

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

15. Разработчики

Калинин В.А., профессор, канд. с-х. наук, Довгилевич Е.В., ст.н.сотр., канд. биол.наук, Довгилевич А.В., ст.н.сотр., канд.хим.наук, Устименко Н.В., ст.н.сотр., канд. биол. наук.

Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева.

Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов». 127550, Москва, Тимирязевская ул., Д. 53/1. [illegible]976-37-68, факс: (095) 976- 43-26.

gost.e-ecolog.ru