Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств 2,4-Д в воде методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2270—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 2,4-Д в воде методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2270-07

ББК 51.21
О-60

О-60 **Определение** остаточных количеств 2,4Д в воде методом капиллярной газожидкостной хроматографии. Методические указания. – М · Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 14с.

1 Разработаны Российским государственным аграрным университетом - МСХА им К А Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Агроэкотоксикология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России – (В А. Калинин., Т.С. Калинина. О И Рыбакова. Л В Горячева)

2 Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно – гигиеническому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия населения (протокол № 2 от 21 июня 2007 г)

3 Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия населения, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г Г Онищенко 24 сентября 2007 г.

4. Введены в действие с 15 декабря 2007 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Формат 60х88/16 **Печ. л. 1,0**

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
24 сентября 2007 г.

Дата введения: 15 декабря 2007 г.

Определение остаточных количеств 2,4-Д в воде методом капиллярной газожидкостной хроматографии

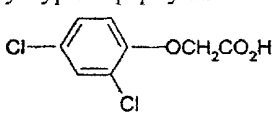
Методические указания МУК 4.1.2270-07

Настоящие методические указания устанавливают метод капиллярной газожидкостной хроматографии для определения в воде массовой концентрации 2,4-Д в диапазоне 0,0001 - 0,01 мг/дм^3.

Название действующего вещества по ИСО: 2,4-Д.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_8H_6Cl_2O_3$.

Молекулярная масса: 221,0.

Белое кристаллическое вещество.

Давление паров: 0,011 mPa (20°C).

Температура плавления: 141°C.

Коэффициент распределения в системе н-октанол – вода K_{ow} logP = 2,58 – 2,83 (pH 1).

Растворимость в воде 311 мг/л (pH 1, 25^{0}C), 0,6 г/л (20°C). В этаноле 1250, диэтиловом эфире 243, гептане 1,1 (все в г/кг. 20°C).

2,4-Д стабильна в растворах сильных кислот и образует водорастворимые соли со щелочными металлами и аминами. pKa = 2,73.

Краткая токсикологическая характеристика: 2,4-Д (кислота) относится к умеренно опасным веществам по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс – 639 - 764 мг/кг, для мышей - 138 мг/кг), ингаляционной токсичности [$ЛК_{50}$ (24 час) для крыс >1,79 мг/л воздуха] и малоопасным по кожно-резорбтивной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс более 1600 мг/кг).

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД - 0,0001 мг/кг/сутки; ПДК в воде водоёмов – 0,0002 мг/дм^3 (санитарно-токсикологический показатель).

Область применения препарата: 2,4-Д – селективный, системный гербицид, эффективно подавляющий рост и развитие большинства двудольных широколистных сорных растений в посевах злаковых культур.

Применяется в России в виде солей и эфиров в качестве гербицида для подавления однолетних двудольных сорных растений в посевах зерновых колосовых культур, просо, сорго, кукуруза и многолетних злаковых трав при норме расхода 0,85-2,4 л/га.

Определение остаточных количеств 2,4-Д в воде методом капиллярной газожидкостной хроматографии

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.

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 повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %
Вода	0,005 - 0,01	100	9,3	26	32
	0,005 – 0,0001	150	11,2	31	39

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата

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, ±, %
1	2	3	4	5	6
Вода	0,0001	0,0001 – 0,01	92,4	6,2	92,4 ± 9,32

2. Метод измерений

Метод основан на определении 2,4-Д в виде бутилового эфира с помощью капиллярной газожидкостной хроматографии с электронозахватным детектором после экстракции ее органическим растворителем, очистки экстракта путем перераспределения между двумя несмешивающимися растворителями и бутилирования. Идентификация проводится по времени удерживания. Количественное определение - методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Избирательность метода достигается за счет подбора колонки и условий программирования.

3. Средства измерений, реактивы, вспомогательные устройства и материалы

3.1. Средства измерений

Весы аналитические Σ 11140, фирма «OHAUS».

Колбы мерные вместимостью 10, 50 и 100 см^3, ГОСТ 1770-74;

Микрошприц Гамильтон, вместимостью 10 мм^3;

Пипетки мерные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см^3, ГОСТ 20292-74.

Хроматограф газовый «Кристалл 2000м» с детектором по захвату электронов (ЭЗД) с пределом детектирования по Линдану 4×10^{-14} г/см^3 и приспособлениями для капиллярной колонки.

Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100 и 250 см^3, ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Аналитический стандарт 2,4-Д, с содержанием д.в. 99,8%.
Азот особой чистоты, ГОСТ 9293-74.
н-Бутанол, х.ч., ГОСТ 6006-78, свежеперегнанный.
Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72.
н-Гексан, ч., ТУ 6-09-3375-78.
Гелий, очищенный марки "А", ТУ-51-940-80.
Кислота серная концентрированная, ч., ГОСТ 4204-77.,
Кислота серная, 2% раствор в бутаноле (бутилирующая смесь).
Кислота серная, 4н водный раствор.
Натрий сернокислый, безводный, х.ч. ГОСТ 4166-76.
Натрия бикарбонат, х.ч., ГОСТ 4201.
Натрия бикарбонат–5% водный раствор
Эфир диэтиловый (для наркоза. Фармакопея СССР).
Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Бумага индикаторная, универсальная.
Виалы с тефлоновыми прокладками, Aldrich, cat. № Z27,702-9.
Воронки химические для фильтрования, стеклянные, ГОСТ 861375;
Воронки делительные на 1000 см^3, ГОСТ 10054-75;
Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi с водяной баней B-480;
Колбы конические плоскодонные на 250 см^3, ГОСТ 10394-72.
Концентраторы грушевидные на 100 и 250 см^3, НШ 29 КГУ – 100 (250) ГОСТ 10394-72.
Колонка капиллярная кварцевая HP-5, (Crosslinked 5 % фенилсиликсана и 95 % ме-тилсилоксана), длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм.
Насос вакуумный диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laboport.
Фильтры бумажные "красная лента", ТУ 6-09-2678-77.
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 изменений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха $(20\pm5)^0$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

7.1. Приготовление раствора для бутилирования

В мерную колбу объемом 100 см^3 наливают 50 см^3 предварительно перегнанного н-бутанола и осторожно приливают туда 2 см^3 концентрированной серной кислоты. Раствор перемешивают и доводят объем до метки бутанолом. Бутилирующую смесь хранят под тягой в течение одного месяца. Перед приготовлением раствора н-бутанол перегоняют.

7.2. Приготовление 4н раствора серной кислоты

Раствор готовят под тягой, строго соблюдая технику безопасности.

В мерную колбу объемом 1 дм^3 наливают 500 см^3 и туда осторожно приливают 112 см^3 концентрированной серной кислоты. Внимание! Происходит разогревание жидкости! Раствор осторожно перемешивают и добавляют около 150 см^3 воды. Когда раствор остынет, его доводят водой до метки.

7.3. Приготовление 5% раствора гидрокарбоната натрия

В стакан на 500 см^3 помещают 50 г гидрокарбоната натрия. Приливают около 200 см^3 воды и растворяют осадок, выдерживая стакан в ультразвуковой ванне и помешивая стеклянной палочкой. Раствор переливают в мерную колбу на 1 дм^3. При необходимости процедуру повторяют. После полного растворения осадка раствор в колбе доводят водой до 1 дм^3.

7.4. Приготовление стандартных растворов

Взвешивают 50 мг 2,4-Д кислоты в мерной колбе на 50 мл, растворяют навеску в этаноле и доводят объем до метки этанолом (стандартный раствор №1, концентрация 1 мг/мл). Стандартный раствор № 1 можно хранить в холодильнике в течение 1 месяца.

Методом последовательного разбавления готовят стандартный раствор № 2 с концентрацией 0,5 мкг/мл.

7.5. Бутилирование 2,4-Д из стандартного раствора

Для приготовления градуировочных растворов отбирают 1 мл стандартного раствора № 2 (концентрация – 0,5 мкг/см^3) в виалу и удаляют растворитель током теплого воздуха. К сухому остатку в виале добавляют 1 см^3 2% раствора концентрированной серной кислоты в бутаноле. Плотно закрывают виалу крышкой и помещают в блок для виал, нагретый до 100^0 С. Бутилирование проводят в течение 30 минут. Далее виалу охлаждают до комнатной температуры и добавляют в нее 5 см^3 гексана и 20-25 см^3 дистиллированной воды. Смесь интенсивно встряхивают и выстаивают до полного разделения фаз. Верхний гексановый слой используют для приготовления стандартных растворов, которые

применяют при построении градуировочного графика. Концентрация 2,4-Д в гексановом растворе составляет 0,1мкг/ $см^3$ (раствор № 3).

7.6. Приготовление градуировочных растворов

Методом последовательного разбавления раствора 2,4-Д № 3 гексаном в мерных колбах готовят рабочие растворы с концентрациями: 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 мкг/$см^3$, которые могут храниться в холодильнике не более 10 сут.

7.7. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации 2,4-Д в растворе (мкг/$см^3$), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4-м растворам для градуировки с концентрацией 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 мкг/$см^3$.

В испаритель хроматографа вводят по 1 $мм^3$ (капиллярная колонка) каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.2. Осуществляют не менее 3-х параллельных измерений.

По полученным данным строят градуировочный график зависимости площади хроматографического пика в мВ от концентрации 2,4-Д в растворе в мкг/$см^3$.

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 г., а также в соответствии с ГОСТами Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

Пробы воды анализируют в день отбора или замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильной камере при температуре – 18^0С не более 2-х недель.

9. Выполнение определений

9.1. Вода.

9.1.1. Экстракция и очистка экстракта

Из среднего образца воды отбирают 500 мл в делительную воронку объемом 1000 мл. Пробу воды в воронке подкисляют 4н серной кисло-

той до pH=2, добавляют 100 мл этилового эфира. Делительную воронку встряхивают в течение двух минут (Осторожно, необходимо дегазировать смесь!) и после полного разделения слоев нижний водный слой собирают в плоскодонную колбу, а верхний эфирный слой переносят в концентратор. Водную фазу возвращают в делительную воронку и повторяют экстракцию 2,4-Д еще два раза, используя каждый раз по 50 мл эфира. Далее, водную фазу отбрасывают, а объединенный эфирный экстракт переносят в делительную воронку объемом 500 мл и экстрагируют 2,4-Д 5% водным раствором бикарбоната натрия.

Для этого в делительную воронку добавляют 50 мл 5% водного раствора бикарбоната натрия, встряхивают воронку в течение двух минут и после полного разделения слоев нижний водный слой собирают в плоскодонную колбу на 250 мл. Повторяю процедуру еще два раза, используя каждый раз по 50 мл 5% водного раствора бикарбоната натрия, после эфир отбрасывают. Объединенную водную фазу подкисляют 4н серной кислотой до pH=2 (Осторожно, вспенивание!) и переносят в делительную воронку, добавляют 50 мл диэтилового эфира, встряхивают воронку две минуты (Осторожно, необходимо дегазировать смесь!). После полного разделения слоев нижний водный слой собирают в стакан, а верхний эфирный слой в концентратор, пропуская через безводный сульфат натрия. Водную фазу возвращают в воронку и повторяют экстракцию еще два раза, используя каждый раз по 30 мл эфира. Объединенную эфирную фракцию упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 30^0С.

Сухой остаток переносят тремя порциями по 2 мл диэтилового эфира в виалу, и удаляют органический растворитель под током теплого воздуха.

9.1.2. Бутилирование

К сухому остатку в виале добавляют 1 $см^3$ 2% раствора концентрированной серной кислоты в бутаноле. Плотно закрывают виалу крышкой и помещают в блок для виал, нагретый до 100^0 С. Бутилирование проводят в течение 30 минут. Далее виалу охлаждают до комнатной температуры и добавляют в нее 5 $см^3$ гексана и 20-25 $см^3$ дистиллированной воды. Смесь интенсивно встряхивают и выстаивают до полного разделения фаз. Из верхнего гексанового слоя аликвоту 1 мкл вводят в хроматограф.

9.2. Условия хроматографирования

Хроматограф газовый "Кристалл 2000М" с электронозахватным детектором (ЭЗД).

Капиллярная кварцевая колонка HP-5, (Crosslinked 5 % PH ME Siloxane), длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки 0.25 мкм.

Температура детектора – 320°С, испарителя – 230°°С.

Программированный нагрев колонки – с 120°С до 200°°С по 4 град./мин, с 200°С до 240°С по 6 град/мин.

Газ 1: тип регулятора расхода газа РРГ 11, давление 84 кПа.

Газ 2 (гелий) – расход 0,5 мл/мин, сброс 1:80.

Режим Splitless, начало сброса 15 сек, длительность сброса 5 мин, минимальный расход 20 мл/мин.

Газ 3 (азот, поддув детектора) – 60 мл/мин.

Продувка детектора и испарителя по 60 мл/мин в течение 2 минут при температуре колонки 240°С.

Абсолютное время удерживания бутилового эфира 2,4-Д - 20 мин 18 сек, окно 1%.

Объем пробы, вводимый в испаритель – 1 мкл.

Образцы, дающие площадь пика больше, чем стандартный раствор с концентрацией 0,01 мкг/мл, разбавляют.

Альтернативные условия хроматографирования.

Хроматограф газовый «Кристалл-2000М» с детектором электронного захвата ионов.

Колонка капиллярная DB-5, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщина пленки сорбента 0,25 мкм

Температура детектора: 320°С

испарителя: 230°С

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура - 200°С, выдержка 1 мин, нагрев колонки со скоростью 7,5 град./мин до температуры 240°С. Время анализа 15 мин.

Скорость газа 1 (азот): 30,5 см/сек, давление 120 кПа, поток 0,94 $см^3$/мин,

Газ (2): деление потока 1 : 6; сброс 5,7 $см^3$/мин

Продувка: температура колонки 280°С, время 5 мин, газ (1): 120 кПа;

газ (2): 5 $см^3$/мин

Хроматографируемый объем: 2 $мм^3$

Ориентировочное время удерживания бутилового эфира 2,4-Д: 5,13 мин

Линейный диапазон детектирования: 0,02 – 0,2 нг

10. Обработка результатов анализов

Для обработки результатов анализов используется "Программа сбора и обработки хроматографической информации Хроматек Аналитик", версия 1.20.

Содержание 2,4-Д рассчитывают по формуле:

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

где X - содержание 2,4-Д в пробе, мг/кг;

Sст - высота (площадь) пика стандарта, мВ;

Sпр - высота (площадь) пика образца, мВ;

A - концентрация стандартного раствора, мкг/мл;

V - объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, мл;

m - масса анализируемого образца, г;

P - содержание 2,4-Д в аналитическом стандарте, %.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ - граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 0,0001мг/кг»*

* - 0.0001 мг/кг - предел обнаружения.

13. Контроль качества результатов

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 $K_к$ рассчитывают по формуле:

$K_к = \bar{X}' - \bar{X} - C_д$,

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:

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

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), %.

14. Разработчики

Калинин В.А., профессор, канд. с-х. наук, Калинина Т.С., ст.н. сотр., канд. с-х. наук, Рыбакова О.И., науч. сотр. Горячева Л.В.

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

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

gost.e-ecolog.ru