Государственное санитарно-эпидемнологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств ципросульфамида в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3419—17

Издание официальное

Москва • 2017

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 ципросульфамида в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3419—17

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств ципросульфамида в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017.—19 с.

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научный консультационный центр «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (А. В. Довгилевич, Е. В. Довгилевич, Е. Н. Тестова, Ю. Н. Савушкин).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 22 декабря 2016 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 14 февраля 2017 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 09.10.17

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,25

Тираж 125 экз. Заказ

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994. Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
14 февраля 2017 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств ципросульфамида в зерне нута методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3419—17

Свидетельство о метрологической аттестации МВИ № РОСС RU.0001.310430/0255.12.02.2016 от 12.02.2016.

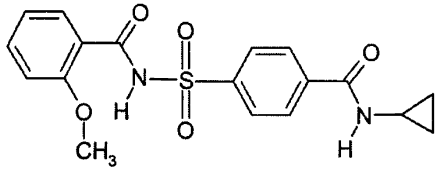
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств ципросульфамида в зерне нута в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Ципросульфамид

Название действующего вещества по ИЮПАК:*N*-{[(4-циклопропилкарбамоил)фенил]сульфо-нил}-2-метоксибензамид.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{18}N_2O_5S$.

Молекулярная масса: 374.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белый с легким характерным запахом.

Давление паров: $5{,}72 \times 10^{-9}$ Па (при 20 °С); $1{,}10 \times 10^{-8}$ Па (при 25 °С); $2{,}19 \times 10^{-7}$ Па (при 50 °С).

Коэффициент распределения октанол–вода: logP K_{ow} = 1,77 (pH 4), logP K_{ow} = –0,80 (pH 7), logP K_{ow} = –1,81 (pH 9).

Температура плавления: выше 450 °С.

Растворимость в воде (мг/дм^3, при 20 °С): при pH 4 – 0,0034; pH 5,1 – 0,0125; pH 6,9 – 1,09; pH 8,1 – 26,1.

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, при 20 °С): ацетон – 3,1; н-гексан < 0,001; диметилсульфоксид > 200; дихлорметан – 3,5; толуол – 0,0047; этанол – 0,47; этилацетат – 0,51.

Стабилен в водных растворах при pH 3—10 и температуре 22 °С до 20 месяцев.

Краткая токсикологическая характеристика. Ципросульфамид относится к мало опасным по острой оральной ($ЛД_{50}$ для крыс более 2 000 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс более 2 000 мг/кг), но к умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 ч) более 3 513 мг/м^3).

Область применения. Ципросульфамид – антидот, обеспечивающий достаточно высокий уровень толерантности культуры к гербицидному препарату.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,08 мг/кг массы тела человека; ОДК в почве – 0,24 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,07 мг/дм^3; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,8 мг/м^3; ОБУВ в атмосферном воздухе – 0,01 мг/м^3; МДУ в продукции (мг/кг): кукуруза (зерно, масло) – 0,1.

1. Погрешность измерений

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 табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

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

Таблица 1

Метрологические параметры для ципросульфамида

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, %
Зерно нута	0,01—0,1 вкл.	50	6	17	24

Таблица 2

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

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 нута	0.01	0,01—0,1	79,42	4.70	1,75

2. Метод измерений

Метод основан на определении ципросульфамида с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на колонках с окисью алюминия.

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 класса точности – специальный (I) с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г ГОСТ Р 53228—08

Весы лабораторные общего назначения класса точности – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 400 г и пределом допустимой погрешности ± 0,5 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
pH-метр/милливольтметр с диапазоном измерения 0—14 pH; ± 1 999 мВ	
Хроматографическая система, включающая: – хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$ для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему; – компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ	
Цилиндры мерные на 10, 25, 50, 100 и 500 $см^3$	ГОСТ 1770—74

Примечание. Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Ципросульфамид, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 98,6 %	CAS 221667-31-8
Алюминий окись для хроматографии, ч	ТУ 6-09-3916—75
Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм	ТУ 6-09-2167—84
Вода дистиллированная и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной емкости)	ГОСТ 6709—72
n-Гексан, хч	ТУ 6-09-3818—89
Калий фосфорнокислый двузамещенный, 3-водный, чда	ГОСТ 2493—75

Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Кислота муравьиная, чда	ГОСТ 5848—73
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Кислота уксусная, ледяная, хч	ГОСТ 61—75
Метилен хлористый, хч	ТУ 6-09-2662—77
Натрия гидроокись, хч	ГОСТ 4328—77
Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый, кислый, хч	ГОСТ 4201—79
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77

Примечание. Допускается использование реактивов с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума для работы с концентрирующими патронами	ГОСТ 25336—82
Банки полипропиленовые с крышками для экстракции вместимостью 250 $см^3$	
Ванна ультразвуковая с потребляемой мощностью 140 Вт, рабочей частотой 50 Гц, рабочим объемом 4,5 $дм^3$	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Виалы объемом 2 $см^3$, закрываемые завинчивающейся или запрессовывающейся крышкой с тефлонированной резиновой прокладкой, прокалываемой микрошприцем для автоматического дозатора проб	
Воронки делительные на 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные стеклянные	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, с диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 $см^3$, с изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, с водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 $дм^3$ и с диапазоном температур от 20 до 100 °С	
Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82

Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 $см^3$ и 4 000 $см^3$ ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная длиной 150 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18	
Насос диафрагменный, химически стойкий на 100 %, с мощностью электропривода 245 Вт, предельным вакуумом 100 мбар/абс, с избыточным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 $дм^3$/мин	
Предколонка хроматографическая стальная, длиной 12,5 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18	
Стаканы стеклянные термостойкие объемом 100—500 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Установка для перегонки растворителей с круглодонной колбой объемом 4 000 $см^3$ и приемной конической колбой объемом 1 000 $см^3$	
Фильтры обеззоленные нейтральные, быстро фильтрующие, диаметром 11 см, зольность одного фильтра 0,00072 г	ТУ 6-09-1678—86

Примечание. Допускается применение 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—76, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. 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—91.

5. Требования к квалификации операторов

Измерения в соответствии с настоящей методикой может выполнять специалист, имеющий опыт работы на жидкостном хроматографе, освоивший данную методику и подтвердивший экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

– процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С, относительной влажности не более 80 % и нормальном атмосферном давлении;

– 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 колонок с окисью алюминия для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с окисью алюминия и установление градуировочной характеристики.

7.1.1. Очистка ацетонитрила

Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм^3. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем ацетонитрил сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей.

Ацетонитрил перегоняют при температуре 81,5 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 81,5 °С, отбрасывают.

7.1.2. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллированную воду помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к ней марганцовокислый калий из расчета 1 г/дм^3 и кипятят в течение 6 часов.

Собирают фракции, отогнанные при температуре 100,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 100,0 °С, отбрасывают.

7.1.3. Очистка хлористого метилена

Хлористый метилен промывают равным объемом 5%-го раствора натрия углекислого (безводного), осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм^3. Выдерживают его над осушителем в течение 12—24 часов. Затем хлористый метилен сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей. Хлористый метилен перегоняют при температуре 40,0 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 40,0 °С, отбрасывают.

7.1.4. Очистка гексана

Гексан, содержащий воду, предварительно осушают, добавляя в него гранулированный безводный хлористый кальций из расчета не менее 100 г/дм^3. Выдерживают его над осушителем в течение 5—6 часов. Затем гексан сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей.

Гексан перегоняют при температуре 68,7 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 68,7 °С, отбрасывают.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление рабочих растворов

7.2.1.1. Приготовление 0,1%-го водного раствора муравьиной кислоты. В мерную колбу объемом 1 дм^3 помещают 500 см^3 бидистиллированной воды, прибавляют 1,0 см^3 муравьиной кислоты, перемешивают, объем доводят до метки бидистиллированной водой.

7.2.1.2. Приготовление 6 М раствора соляной кислоты. Мерным цилиндром отбирают 246 см^3 концентрированной соляной кислоты и осторожно переносят в мерную колбу на 500 см^3, куда предварительно наливают около 100 см^3 дистиллированной воды. Затем раствор перемешивают и после охлаждения доводят водой объем в колбе до метки (при приготовлении раствора соблюдать осторожность и работать под тягой).

7.2.1.3. Приготовление 1 М раствора гидроокиси натрия. В мерную колбу на 500 см^3 переносят 20 г гидроокиси натрия, добавляют 200—300 см^3 дистиллированной воды. Затем раствор перемешивают и после охлаждения доводят водой объем в колбе до метки (при приготовлении раствора соблюдать осторожность и работать под тягой).

7.2.1.4. Приготовление 0,05 М раствора двузамещенного фосфорнокислого калия. В мерную колбу на 500 см^3 переносят 5,7 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ и 50 г NaCl, добавляют 200—300 см^3 бидистиллированной воды,

перемешивают до полного растворения солей, проверяют pH полученного раствора. Если pH раствора менее 9, доводят его до указанного значения с помощью 1 М раствора гидроокиси натрия, контролируя pH. После достижения нужного значения pH объем доводят водой до метки.

7.2.2. Приготовление градуировочных растворов

7.2.2.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией ципросульфамида 100,0 мкг/см^3. Взвешивают 10 мг ципросульфамида в мерной колбе объемом 100 см^3. Навеску растворяют в ацетонитриле и доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученный стандартный раствор № 1 используется для приготовления стандартных растворов для хроматографического исследования и установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 1 хранят в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.2.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией ципросульфамида 10,0 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 2 хранят в холодильнике не более 3 месяцев.

7.2.2.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией ципросульфамида 1,0 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 3 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 3 хранят в холодильнике не более 1 месяца.

7.2.2.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией ципросульфамида 0,5 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 5 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 4 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 4 хранят в холодильнике не более 1 месяца.

7.2.2.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией ципросульфамида 0,2 мкг/см^3. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 2 см^3, помещают в мерную колбу объемом 10 см^3 и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 5 используется для приготовления стандартных растворов

для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 5 хранят в холодильнике не более 1 месяца.

7.2.2.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией ципросульфамида 0,1 мкг/см³. Из стандартного раствора № 3 отбирают пипеткой 1 см³, помещают в мерную колбу объемом 10 см³ и доводят объем до метки смесью ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1. Стандартный раствор № 6 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 6 хранят в холодильнике не более 1 месяца.

7.2.2.7. Стандартные растворы ципросульфамида с концентрациями 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/см³ для внесения в контрольные образцы. Из стандартного раствора № 2 методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/см³ и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы для внесения хранят в холодильнике не более месяца.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации ципросульфамида в растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки с концентрациями 1,0; 0,5; 0,2 и 0,1 мкг/см³.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм³ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.2. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения ципросульфамида на ней

7.4.1. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 1 г окиси алюминия с зернением 40/250 меш и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. Непосредственно перед использованием колонку промывают 10 см³ ацетонитрила.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения ципросульфамида на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 см³ вносят 1 см³ стандартного раствора ципросульфамида в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см³ и упаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см³ ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и наносят на подго-

товленную колонку. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3 и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С, растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и хроматографируют.

Исходную колбу обмывают четырьмя порциями смеси ацетонитрила с ледяной уксусной кислотой в соотношении 99 : 1 объемом 10 см^3 каждая и последовательно вносят их на колонку. Каждую порцию собирают отдельно в концентратор объемом 100 см^3 и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

Определяют фракции, содержащие ципросульфамид, полноту смывания с колонки и необходимый объем элюента.

Изучение поведения ципросульфамида на колонке проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии окиси алюминия.

7.5. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку с предколонкой устанавливают в термостате хроматографа и стабилизируют при температуре 30 °С и скорости потока подвижной фазы 0,7 см^3/мин 3—4 часа.

8. Отбор проб и хранение

Отбор проб проводится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», № 2051—79 от 21.08.79, а также в соответствии с ГОСТ 8758—76 «Нут. Требования при заготовках и поставках».

Отобранные пробы зерна нута подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов.

9. Выполнение определения

9.1. Зерно нута

9.1.1. Экстракция и очистка полученного экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Образец измельченного зерна нута массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 см^3, прибавляют 50 см^3 ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну.

Ацетонитрильный экстракт фильтруют через фильтр низкой плотности в делительную воронку объемом 250 см^3. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см^3 ацетонитрила и помещая на 5 минут в ультразвуковую ванну. Экстракты фильтруют и объединяют в делительной воронке объемом 250 см^3.

Ацетонитрильный экстракт в делительной воронке промывают двумя порциями гексана объемом по 50 см^3, каждый раз интенсивно встряхивая воронку по 2 мин. После полного разделения фаз верхний гексановый слой отбрасывают. Ацетонитрильный экстракт переносят в концентратор объемом 250 см^3 через слой безводного сульфата натрия и упаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.1.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К сухому остатку в концентраторе, полученному по п. 9.1.1, прибавляют 5 см^3 ацетонитрила, 50 см^3 щелочного буфера pH 9, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 см^3. Полученную смесь промывают двумя порциями по 30 см^3 хлористого метилена, каждый раз интенсивно встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз нижний слой (хлористый метилен) отбрасывают. Водную фракцию в делительной воронке подкисляют 6 М соляной кислотой до pH 2.

Ципросульфамид экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 20 см^3, каждый раз интенсивно встряхивая воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) объединяют в концентраторе объемом 250 см^3, пропуская его через слой безводного сульфата натрия, и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.3. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток в концентраторе, полученный по п. 9.1.2, растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора, наносят на заранее подготовленную колонку, элюат отбрасывают. Исходную колбу обмывают 30 см^3 смеси ацетонитрила с ледяной уксусной кислотой в соотношении 99 : 1 и вносят на колонку. Элюат собирают в концентратор объемом 100 см^3, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 см^3 смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 мм^3 пробы вводят в хроматограф.

9.2. Условия хроматографирования

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный с диодно-матричным детектором, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и с возможностью использования стандартного автосамплера с дозирующим объемом от 0,1 до 100 мм^3 для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему;

– компьютерное программное обеспечение, контролирующее работу всего прибора, обеспечивающее сбор и хранение всех хроматограмм в процессе проведения хроматографического анализа, обеспечивающее обработку результатов измерений, вывод и расчет хроматограмм и количественный анализ.

Колонка хроматографическая стальная длиной 150 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая стальная длиной 12,5 мм, с внутренним диаметром 2,1 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1%-я муравьиная кислота в соотношении 60 : 40.

Скорость потока подвижной фазы 0,7 см^3/мин.

Длина волны: 250 нм.

Чувствительность не менее 8 *mAU* (миллиединиц абсорбции) на шкалу.

Объем вводимой пробы: 20 мм^3.

Линейный диапазон детектирования сохраняется в пределах 2—20 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор ципросульфамида с концентрацией 1,0 мкг/см^3, соответственно разбавляют.

10. Обработка результатов

Для обработки результатов хроматографического анализа используется компьютерное программное обеспечение химического анализа, которое входит в хроматографическую систему.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание ципросульфамида рассчитывают по формуле без учета полноты извлечения вещества из проб:

$$X = \frac{S_{пр} \cdot A \cdot V}{100 \cdot S_{ст} \cdot m} \cdot P, \text{ где}$$

X – содержание ципросульфамида в пробе, мг/кг;
$S_{ст}$ – высота (площадь) пика стандарта, мм;
$S_{пр}$ – 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;
P – содержание ципросульфамида 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:

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;
r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8 \times \sigma_r$.

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:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \overline{X}}{100}, \text{ где}$$

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

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

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

* 0,01 мг/кг – предел обнаружения.

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений, а также контроль стабильности градуировочной характеристики осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—02 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

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

Контроль стабильности градуировочной характеристики для ципросульфамида проводят при смене основного градуировочного раствора № 1 каждые шесть месяцев, при смене основного градуировочного раствора № 2 – каждые три месяца, при смене основных градуировочных растворов 3, 4, 5 и 6 – каждый месяц, а также в начале и по окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание ципросульфамида в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см^3.

Градуировочная характеристика считается стабильной, если для каждого из используемого для контроля градуировочного раствора сохраняется соотношение:

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 3{,}45\text{, где}$$

X – концентрация ципросульфамида контрольного измерения, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора ципросульфамида в смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

3,45 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (А) превышает 3,45 %, делают вывод о невозможности применения градуировочной характеристики для дальнейших измерений. В этом случае выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики и повторяют контроль ее стабильности с использованием других градуировочных растворов ципросульфамида, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики определяют ее заново согласно п. 7.3.

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится методом добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

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

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

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\ \Delta, \text{ где}$$

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \bar{X}' - \bar{X} - C_д, \text{ где}$$

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

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию:

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (2) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (2) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.

Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R):

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

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

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

Приложение 1

Полнота извлечения ципросульфамида из зерна нута (5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)

Среда	Внесено ципросульфамида, мг/кг	Обнаружено ципросульфамида, мг/кг	Полнота определения, %
Зерно нута	0,01	0,0080 ± 0.0006	79,6
	0,025	0,0200 ± 0,0005	79,9
	0,050	0.0412 ± 0,0020	82.4
	0.10	0,0758 ± 0.0019	75.8

gost.e-ecolog.ru