Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пентиопирада в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3371—16

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 пентиопирада в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3371—16

ББК 51.23
О-62

О-62 **Определение** остаточных количеств пентиопирада в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1550—0

1. Разработаны Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева, Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России (В. А. Калинин, Е. В. Довгилевич, А. В. Довгилевич, Н. В. Устименко, Е. Н. Тестова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 20 мая 2016 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 5 июля 2016 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 01.03.17

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 125 экз. Заказ 15

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
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
5 июля 2016 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пентиопирада в зерне и соломе зерновых колосовых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.3371—16

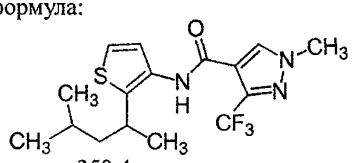
Свидетельство о метрологической аттестации РОСС RU.0001.310430/0213.16.10.14 от 16.10.2014.

Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения уровня остаточных количеств пентиопирада в зерне в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг и в соломе зерновых колосовых культур в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг. Методические указания носят рекомендательный характер.

Пентиопирад

(*RS*)-*N*-[2-(1,3-диметилбутил)-3-тиенил]-1-метил-3-(трифторметил)-1*H*-пиразол-4 карбоксамид

Структурная формула:



Молекулярная масса: 359,4.

Эмпирическая формула: $C_{16}H_{20}F_3N_3OS$.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белый, без запаха.

Давление паров: $6{,}43 \times 10^{-6}$ Па (25 °С).

Коэффициент распределения октанол–вода: log K_{ow} = 4,36 (pH 4); log K_{ow} = 4,62 (pH 7); log K_{ow} = 4,54 (pH 10).

Температура плавления: 108,7 °С.

Растворимость в воде (мг/дм^3, при 20 °С): 7,53.

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, 20 °С): ацетон – 557; н-гексан – 0,75; гептан – 0,74; дихлорметан – 531; ксилол – 42,7; толуол – 67,0; метанол – 402; этанол – 234,5; этилацетат – 349.

Стабилен в водных растворах при pH 3—10 и температуре 20 °С в низких концентрациях (менее 1 мг/дм^3).

Краткая токсикологическая характеристика. Пентиопирад относится к малоопасным 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 часа) более 5 669 мг/м^3). Не раздражает кожу и слизистую оболочку глаз. Не является мутагеном.

Область применения. Пентиопирад – системный фунгицид, ингибирует процесс дыхания грибов путем связывания с митохондриальным дыхательным комплексом II, останавливает прорастание спор, ингибирует рост мицелия и обладает сильным антиспоруляционным действием.

Пентиопирад используется для борьбы с паршой и мучнистой росой на яблонях с нормой расхода 0,375—1,125 л/га.

Пентиопирад рекомендуется для борьбы с грибковыми заболеваниями зерновых колосовых культур – септориозом, фузариозом, сетчатой пятнистостью, листовой ржавчиной и мучнистой росой в дозах 125—1 000 г действующего вещества на гектар.

В России установлены следующие гигиенические нормативы: ДСД – 0,13 мг/кг массы тела человека; ОДК в почве – 0,9 мг/кг; ПДК в воде водоемов – 0,02 мг/дм^3; ОБУВ в воздухе рабочей зоны – 0,8 мг/м^3; ОБУВ в атмосферном воздухе – 0,02 мг/м^3; МДУ в сельскохозяйственной продукции (мг/кг): плодовые семечковые – 0,5.

МДУ в импортируемой продукции (мг/кг): зерно пшеницы – 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 пентиопирада

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 пшеницы	0,01—0,1 вкл.	50	3,90	10,84	15,18
Солома пшеницы	0,05—0,1 вкл.	50	1,72	4,78	6,69
	0,2—0,5 вкл.	25	1,34	3,73	5,22

Таблица 2

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

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 пшеницы	0,01	0,01—0,1	75,40	2,63	0,93
Солома пшеницы	0,05	0,05—0,5	74,23	2,14	0,74

2. Метод измерений

Определение пентиопирада осуществляется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта на колонках с окисью алюминия и на концентрирующих патронах № 1 и 2.

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 по ГОСТ Р 53228-2008 – специальный (I), с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г	
Весы лабораторные общего назначения класса точности по ГОСТ Р 53228—08 – средний (III) с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	
Колбы мерные на 10, 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Микрошприц объемом 100 $мм^3$ со шкалой деления 0,001 $см^3$ и погрешностью менее 1 % от номинального объема	
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Хроматографическая система, включающая: – хроматограф жидкостной, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу; – 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 и 50 $см^3$	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Пентиопирад, CAS 183675-82-3, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,9 %	
Алюминия 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
Гелий, очищенный	ТУ 51-940—80
Калий марганцовокислый, чда	ГОСТ 20490—75
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Кислота муравьиная, чда	ГОСТ 5848—73
Концентрирующие патроны для твердофазной экстракции с гидрофобным сорбентом с размером частиц 63—200 мкм с привитыми октильными (С8) группами (объем – 1 $см^3$, масса сорбента – 0,6 г) (патрон № 1)	ТУ 4215-002-05451931—94
Натрий сернокислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76

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
Аппарат для встряхивания проб с возвратно-поступательным направлением колебаний, с максимальной загрузкой 10 кг, с амплитудой колебаний 30 мм и скоростью от 10 до 300 колебаний в минуту	
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
Воронки лабораторные, стеклянные	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный вакуумный с ручным подъемником, диагональным конденсором и объемом испарительной колбы от 50 до 3 000 $см^3$, изменяемой скоростью вращения штока испарителя от 5 до 240 об./мин, водяной баней с антикоррозионным покрытием объемом 5 $дм^3$ и 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 250 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., избыточным давлением 1 бар и скоростью откачки 34 $дм^3$/мин	
Предколонка хроматографическая стальная длиной 20,0 мм, с внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8	
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
Центрифуга лабораторная настольная с максимальным рабочим числом оборотов 4 000 об./мин, с рабочим объемом ротора 200 $см^3$ × 4 ячейки, с выбираемым временным диапазоном работы от 0 до 100 мин и с набором полипропиленовых банок емкостью 200 $см^3$	
Шприц инъекционный многократного применения объемом 10 $см^3$	ГОСТ 22967—90

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 электроус-

тановками 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

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение и владеющие техникой проведения анализа, освоившие метод анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы контроля при проведении процедуры контроля погрешности анализа.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

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

– измерение 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, подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с окисью алюминия и концентрирующих патронах № 1 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.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление рабочих растворов

7.2.1.1. Приготовление 0,1 % 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.

7.2.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанные ацетонитрил и 0,1 % раствор муравьиной кислоты.

В плоскодонную колбу объемом 1 $дм^3$ помещают 600 $см^3$ ацетонитрила и 350 $см^3$ 0,1 % муравьиной кислоты. 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.

7.2.3. Приготовление градуировочных растворов

7.2.3.1. *Стандартный раствор № 1 с концентрацией пентиопирада 1,0 мг/$см^3$*. Взвешивают 50 мг пентиопирада в мерной колбе объемом 50 $см^3$. 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 хранится в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.2.3.2. *Стандартный раствор № 2 с концентрацией пентиопирада 10,0 мкг/$см^3$*. Из стандартного раствора № 1 отбирают пипеткой 1 $см^3$, помещают в мерную колбу объемом 100 $см^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом. Стандартный раствор № 2 используется для приготовления стандартных растворов для установления градуировочной характеристики. Стандартный раствор № 2 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.3. *Стандартный раствор № 3 с концентрацией пентиопирада 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 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.4. *Стандартный раствор № 4 с концентрацией пентиопирада 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 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.5. *Стандартный раствор № 5 с концентрацией пентиопирада 0,2 мкг/см^3.* Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 50 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 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.6. *Стандартный раствор № 6 с концентрацией пентиопирада 0,1 мкг/см^3.* Из стандартного раствора № 2 отбирают пипеткой 1 см^3, помещают в мерную колбу объемом 100 см^3 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 № 5 хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.7. *Стандартные растворы пентиопирада с концентрацией 2,0; 1,0; 0,5 и 0,2 мкг/см^3 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/см^3 и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы. Стандартные растворы для внесения хранят в холодильнике не более 2 месяцев.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации пентиопирада в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 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. 9.3. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

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

7.4.1. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта

В пластиковую или стеклянную колонку диаметром 15 мм помещают 3 г окиси алюминия с зернением 40/250 меш. и, аккуратно постукивая по стенкам колонки, формируют слой адсорбента. Непосредственно перед использованием колонку промывают 10 см^3 ацетонитрила.

7.4.2. Проверка хроматографического поведения пентиопирада на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 см^3 вносят 1 см^3 стандартного раствора пентиопирада в ацетонитриле с концентрацией 1,0 мкг/см^3 и выпаривают его досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см^3 ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и наносят на подготовленную колонку. Элюат собирают в концентратор и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор последовательно обмывают двумя порциями по 10 см^3 ацетонитрила. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы объемом по 100 см^3 и выпаривают 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 пентиопирад, полноту смывания с колонки и необходимый объем элюента.

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

7.5. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения пентиопирада на них

7.5.1. Подготовка концентрирующих патронов № 1 для очистки экстракта

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

Патрон № 1 устанавливают на алонж с отводом для вакуума, сверху в патрон вставляют шприц с разъемом типа Луер объемом не менее 10 $см^3$ (используют как емкость для элюентов).

Кондиционирование: концентрирующий патрон промывают 5 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 2 : 1 и 10 $см^3$ воды. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения пентиопирада на концентрирующем патроне № 1

Из стандартного раствора пентиопирада в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/$см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и упаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ воды, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С.

Исходный концентратор обмывают последовательно 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 4, 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2, 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислотой в соотношении 60 : 35. Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы 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.

Определяют фракции, содержащие пентиопирад, полноту смывания с патрона и необходимый объем элюента.

Изучение поведения пентиопирада на концентрирующих патронах № 1 проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

7.6. 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 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 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ Р ИСО 6497—11 «Корма для животных. Отбор проб».

Отобранные пробы зерна и соломы 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 пшеницы

9.1.1. Экстракция

Образец измельченного зерна пшеницы массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 $см^3$, прибавляют 50 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну, затем на 5 минут на аппарат для встряхивания проб. Затем пробу центрифугируют в течение 5 минут при скорости 4 000 оборотов в минуту. Ацетонитрильный экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ ацетонитрила в тех же условиях. Ацетонитрильные экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.2. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный в п. 9.1.1, растворяют в 10 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора и вносят на подготовленную колонку, элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ ацетонитрила и вносят на колонку. Элюаты объединяют в концентраторе объемом 100 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.1.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1

Сухой остаток, полученный в п. 9.1.2, растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ воды, перемешивают и вносят на подготовленный патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор последовательно обмывают 10 $см^3$ смеси ацето-

нитрила с водой в соотношении 1 : 4 и 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 2 и последовательно вносят на патрон, элюаты отбрасывают.

Пентиопирад элюируют 10 $см^3$ смеси ацетонитрила с 0,1 % муравьиной кислотой в соотношении 60 : 35. 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. Солома пшеницы

9.2.1. Экстракция

Образец измельченной соломы пшеницы массой 5 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 $см^3$, прибавляют 100 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 5 минут в ультразвуковую ванну, затем на 5 минут на аппарат для встряхивания проб. Пробу центрифугируют в 5 минут при скорости 4 000 оборотов в минуту. Ацетонитрильный экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через фильтр низкой плотности. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 75 $см^3$ ацетонитрила в тех же условиях. Ацетонитрильные экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта, как указано в п. 9.1.2 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия» и п. 9.1.3 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах № 1».

Сухой остаток растворяют в 2,5 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

9.3. Условия хроматографирования

Хроматографическая система, включающая:

– хроматограф жидкостный, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С, с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу;

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

Колонка хроматографическая стальная длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С18.

Предколонка хроматографическая стальная длиной 20,0 мм, с внутренним диаметром 3,9 мм, зернением 5 мкм, заполненная сорбентом с привитыми полярными группами С8.

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1 % муравьиная кислота в соотношении 600 : 350.

Скорость подачи подвижной фазы: 1,0 $см^3$/мин.

Длина волны: 240 нм.

Чувствительность не менее 0,005 AUFS (единиц абсорбции 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 компьютерное программное обеспечение химического анализа, которое входит в хроматографическую систему.

Выполняется альтернативная обработка результатов.

Содержание пентиопирада в пробах 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 пентиопирада 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 пентиопирада 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:

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

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:

$(\bar{X} \pm \Delta)$ мг/кг при вероятности $P = 0{,}95$, где

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 пентиопирада проводят при смене основного градуировочного раствора № 1 каждые шесть месяцев, при смене основных градуировочных растворов № 2, 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 пентиопирада в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см^3.

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

$$A = \frac{(X - C) \cdot 100}{C} \leq 3{,}82 \text{, где}$$

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

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

3,82 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (A) превышает 3,82 %, 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 пентиопирада, 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):

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

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 пентиопирада из зерна и соломы пшеницы (5 повторностей для каждой концентрации, $P = 0,95$)

Среда	Внесено пентиопирада, мг/кг	Обнаружено пентиопирада, мг/кг	Полнота определения, %
Зерно пшеницы	0,01	0,0074 ± 0,0001	73,6
	0,02	0,0151 ± 0,0001	75,3
	0,05	0,0381 ± 0,0011	76,1
	0,10	0,0766 ± 0,0037	76,6
Солома пшеницы	0,05	0,0371 ± 0,0006	74,2
	0,10	0,0729 ± 0,0016	72,9
	0,20	0,1470 ± 0,0025	73,5
	0,50	0,3816 ± 0,0022	76,3

gost.e-ecolog.ru