Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пестицидов в воде, почве, сельскохозяйственном сырье и пищевых продуктах

Сборник методических указаний по методам контроля МУК 4.1.2903—11; 4.1.2904—11; 4.1.2909—11; 4.1.2912—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.21+51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств пестицидов в воде, почве, сельскохозяйственном сырье и пищевых продуктах: Сборник методических указаний по методам контроля.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—84 с.

1. Разработаны: Российским государственным аграрным университетом – МСХА им. К. А. Тимирязева; Учебно-научным консультационным центром «Агроэкология пестицидов и агрохимикатов» Минсельхоза России.

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 2.06.2011 № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 12 июля 2011 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.21+51.23

Редактор Н. Е. Акопова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 31.01.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 5,25

Тираж 200 экз. Заказ 3

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

Определение остаточных количеств Биксафена в воде, почве, зерне и соломе зерновых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2903—11 4

Определение остаточных количеств Ципросульфамида в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2904—11 21

Определение остаточных количеств Тиенкарбазон-метила в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2909—11 44

Определение остаточных количеств Пироксулама в воде, почве, зерне и соломе зерновых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: МУК 4.1.2912—11 65

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
12 июля 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств Тиенкарбазон-метила в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

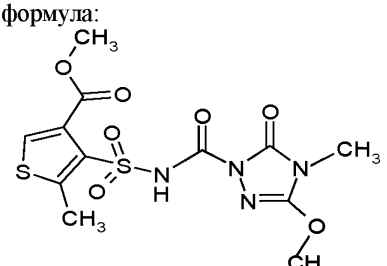
Методические указания МУК 4.1.2909—11

Свидетельство о метрологической аттестации № 0072.06.12.10 от 08.12.2010.

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации Тиенкарбазон-метила в воде в диапазоне 0,005—0,05 мг/дм^3 и в почве в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг, а также уровня его остаточных количеств в зеленой массе кукурузы в диапазоне 0,02—0,2 мг/кг, в зерне и масле кукурузы в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг.

Название действующего вещества по ИЮПАК: 3-тиофенкарбоновая кислота, 4-[[[(4,5-дигидро-3-метокси-4-метил-5-оксо-1Н-1,2,4-триазол-1-ил)карбонил]амино]сульфонил]-5-метил, метиловый эфир.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{12}H_{14}N_4O_7S_2$.

Молекулярная масса: 390,4.

Цвет, запах: химически чистый Тиенкарбазон-метил представляет собой белый порошок с легким характерным запахом.

Температура плавления: > 401 °С.

Температура кипения и замерзания: не определена, т. к. разрушается при 140 °С.

Температура вспышки и воспламенения: более 386 °С.

Плотность: 1,51 г/см^3 при 20 °С.

Давление паров в мм. рт. ст. при Т 20 и 40 °С:

$8{,}8 \times 10^{-14}$ Па при 20 °С (экстраполированный);

$3{,}7 \times 10^{-13}$ Па при 25 °С (экстраполированный);

$2{,}3 \times 10^{-10}$ Па при 50 °С (экстраполированный).

Коэффициент распределения октанол-вода:

	P_{ow}	Log P_{ow}
pH 4	0,738	–0,13
pH 7	0,010	–1,98
pH 9	0,0073	–2,14

Растворимость в воде: 72 мг/л (при 20 °С, pH 3,9).

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, при 20 °С): дихлорметан 100—120, ацетон – 9,54, этилацетат – 2,19, толуен – 0,91, этанол – 0,23, П-гексан – $0{,}15 \times 10^{-3}$.

Краткая токсикологическая характеристика. Тиенкарбазон-метил 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 умеренно опасным веществам по ингаляционной токсичности ($ЛК_{50}$ для крыс (4 ч) более 2 018 мг/м^3 воздуха). Тиенкарбазон-метил нефро- и нейротоксичен.

В организме животных Тиенкарбазон-метил метаболизируется слабо, в растениях разлагается быстро и полностью. Главными метаболитами в растениях являются BYH 18636-MMT-глюкозид и BYH 18636-N-десметил. В полевых условиях $ДТ_{50}$ Тиенкарбазон-метила составляет от 3 до 44,6 дня, $ДТ_{90}$ от 9,9 до 148 дней. Тиенкарбазон-метил фотолитически стабилен. $ДТ_{50}$ в воде составляет от 130 до 148 дней.

Область применения препарата. Тиенкарбазон-метил – гербицид системного действия, быстро поглощается листьями и корневой системой сорняков, свободно перемещается по всему растению с нисходящими и восходящими токами питательных веществ. Благодаря системному действию препарат проникает во все части растения, включая «спящие» почки. На биохимическом уровне гербицид воздействует на фермент

ацетолактатсинтазу (ALS), участвующий в цепи биосинтеза аминокислот, и нарушает процессы синтеза белков, что вызывает прекращение деления клеток в меристемных тканях сорных растений.

Рекомендуется как довсходовый и послевсходовый гербицид для контроля однолетних и многолетних злаковых и двудольных сорняков на посевах кукурузы. Рекомендуемая норма расхода препарата 0,4—0,5 л/га. Способ применения – наземное опрыскивание почвы до всходов культуры (без заделки) или в фазу 2—3 листьев культуры.

В России проходит регистрационные испытания в качестве гербицида для борьбы с однолетними и многолетними злаковыми и двудольными сорными растениями в посевах кукурузы с рекомендуемой нормой расхода по препарату 0,5 $м^3$/га, при однократной обработке за сезон.

МДУ Тиенкарбазон-метила (в импортируемой продукции): зерно кукурузы – 0,01 мг/кг.

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 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 Тиенкарбазон-метила

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 вкл.	40	1,18	3,27	3,89
	0,01—0,05 вкл.	30	0,59	1,64	1,95
Почва	0,01—0,1 вкл.	50	1,16	3,22	3,84
Зеленая масса кукурузы	0,02—0,1 вкл.	50	1,12	3,11	3,71
	0,1—0,2 вкл.	25	0,79	2,18	2,60
Зерно кукурузы	0,01—0,1 вкл.	50	0,81	2,25	2,67
Масло кукурузы	0,01—0,1 вкл.	50	0,86	2,39	2,85

Таблица 2

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для Тиенкарбазон-метила

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Полнота извлечения вещества, %	Стандартное отклонение, S, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Вода	0,005	0,005—0,05	93,03	1,10	0,48
Почва	0,01	0,01—0,1	73,34	2,28	0,78
Зеленая масса кукурузы	0,02	0,02—0,2	72,03	2,34	0,79
Зерно кукурузы	0,01	0,01—0,1	85,77	2,30	0,92
Масло кукурузы	0,01	0,01—0,1	87,60	2,40	0,98

2. Метод измерений

Метод основан на определении Тиенкарбазон-метила методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием диодно-матричного детектора после его экстракции из образцов органическим растворителем, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами, на концентрирующих патронах Диапак Диол 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 «OHAUS», EP 114 с наибольшим пределом взвешивания до 110 г и дискретностью 0,0001 г, класс точности по ГОСТ 24104—2001 – специальный (I)
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 600 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г

«ACCULAB» V600, соответствуют классу точности по ГОСТ 24104—2001 – средний (III)	
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 pH-150 0…14 pH; ± 1999 мВ, номер госрегистрации № 10663	
Хроматограф жидкостный Agilent 1200 LCMS с диодно-матричным детектором G1315B, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и стандартным автосамплером для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему (1200 Series Autosampler с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$); номер госрегистрации 16193-06	
Цилиндры мерные на 10, 25; 50 и 100 $см^3$	ГОСТ 1770—74

Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Тиенкарбазон-метил, CAS 317815-83-1, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 99,6%, фирма Dr. Ehreustorfer GmbH, аккредитованная по ИСО 9001-2000	
Алюминий окись для хроматографии, ч	ТУ 6-09-3916—75
Ацетон, осч	ТУ 6-09-3513—86
Ацетонитрил, осч, УФ-200 нм	ТУ 6-09-2167—84
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72 и (или) бидистиллированная (вода дистиллированная, перегнанная повторно в стеклянной емкости)	
Гелий, очищенный марки «А»	ТУ 51-940—80
n-Гексан, хч	ТУ 6-09-3818—89
Калий марганцово-кислый, чда	ГОСТ 20490—75
Калий фосфорно-кислый двузамещённый, 3-х водный, чда	ГОСТ 2493—75
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Кислота муравьиная, чда	ГОСТ 5848—73
Кислота уксусная, ледяная, хч	ГОСТ 61—75

Концентрирующие патроны Диапак Диол (0,6 г), фирма «БиоХимМак СТ»	ТУ 4215-002-05451931—94
Метилен хлористый, хч	ТУ 6-09-2662—77
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77
Натрий углекислый, кислый, хч	ГОСТ 4201—79
Этилацетат, чда	ГОСТ 22300—76

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.3. Вспомогательные устройства и материалы

Алонж прямой с отводом для вакуума (АО-14/23) для работы с концентрирующими патронами Диапак Диол	ГОСТ 25336—82
Аппарат для встряхивания проб «SKLO UNION TYP LT1»	
Банки с крышками для экстракции на 250 $см^3$, полипропилен, кат. №3120-0250, фирма «NALGENE»	
Ванна ультразвуковая «UNITRA» UNIMA OL-SZTYN UM-4	
Вата медицинская гигроскопическая хлопковая нестерильная	ГОСТ 5556—81
Воронки делительные на 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Воронки лабораторные, стеклянные	ГОСТ 25336—82
Испаритель ротационный Rota vapor R110 Buchi с водяной баней B-480, фирма «Buchi»	
Колбы конические плоскодонные на 100, 250 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Колбы круглодонные со шлифом (концентраторы) на 100, 250 и 4 000 $см^3$ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная, длиной 250 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, Symmetry Shield RP18, зернение 5 мкм, фирма «Waters»	
Насос диафрагменный FT.19, фирма «KNF Neu Laboport»	
Предколонка хроматографическая стальная, Zorbax Eclipse XDB-C8, длиной 12,5 мм,	

внутренним диаметром 2,1 мм, зернение 5 мкм, фирма «Agilent»	
Сито лабораторное с полотном из латуни или нержавеющей стали с размером ячеек 1 мм	ГОСТ 3826—82 и ГОСТ 6613—86
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 бумажные, «красная лента»	ТУ-6-09-1678—86
Фильтры для очистки растворителей, диаметром 20 мм с отверстиями пор 20 мкм, фирма «Waters»	
Центрифуга MPW-350e с числом оборотов 4 000 об./мин и с набором полипропиленовых банок емкостью 200 $см^3$	
Шприц инъекционный однократного применения объемом 10 $см^3$	ГОСТ 24861—91 (ИСО 7886—84)

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 и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование, 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:

• 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, концентрирующих патронов Диапак Диол для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с окисью алюминия и на концентрирующих патронах Диапак Диол, установление градуировочной характеристики.

7.1. Подготовка органических растворителей

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 ч. 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. Очистка ацетона

Ацетон помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей, добавляют к нему марганцово-кислый калий из расчета 1 г/дм^3.

Ацетон перегоняют при температуре 56,2 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 56,2 °С, отбрасывают.

7.1.3. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллированную воду помещают в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 от аппарата для перегонки растворителей,

добавляют к ней марганцово-кислый калий из расчета 1 г/дм^3 и кипятят в течение 6 ч.

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

7.1.4. 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 ч. 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.

7.1.5. Очистка этилацетата

Этилацетат 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 ч. Затем этилацетат сливают с осушителя в круглодонную колбу со шлифом объемом 4 000 см^3 аппарата для перегонки растворителей. Этилацетат перегоняют при температуре 77,1 °С, а фракции, отогнанные при температуре ниже и выше 77,1 °С, отбрасывают.

7.2. Приготовление растворов для проведения анализа

7.2.1. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ

Для приготовления подвижной фазы используют свежеперегнанный ацетонитрил, очищенную воду и муравьиную кислоту.

В плоскодонную колбу объемом 1 000 см^3 помещают 400 см^3 ацетонитрила, 550 см^3 очищенной воды и 1 см^3 муравьиной кислоты. Смесь тщательно перемешивают, пропускают через нее газообразный гелий со скоростью 20 см^3/мин в течение 5 мин, после чего помещают в ультразвуковую ванну для удаления растворенных газов на 1 мин.

7.2.2. Приготовление рабочих растворов

7.2.2.1. 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).

7.2.2.2. Приготовление 1 М раствора гидроокиси натрия.

Переносят в мерную колбу на 500 $см^3$ 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).

7.2.2.3. Приготовление 0,05 М раствора двузамещенного фосфорно-кислого калия.

Переносят в мерную колбу на 500 $см^3$ 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.

7.2.3. Приготовление градуировочных растворов

7.2.3.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией Тиенкарбазон-метила 1,0 мг/$см^3$.

Взвешивают 50 мг Тиенкарбазон-метила 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 Тиенкарбазон-метила 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 Тиенкарбазон-метила 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 при перемешивании. Стандартный раствор № 3 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией Тиенкарбазон-метила 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 при перемешивании. Стандартный раствор № 4 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией Тиенкарбазон-метила 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 при перемешивании. Стандартный раствор № 5 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.6. Стандартный раствор с концентрацией Тиенкарбазон-метила 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 при перемешивании. Стандартный раствор № 6 используется для установления градуировочной характеристики и хранится в холодильнике не более 30 суток.

7.2.3.7. Стандартные растворы Тиенкарбазон-метила с концентрацией 5,0; 2,0; 1,0; 0,4; и 0,2 мкг/см^3 для внесения в образцы.

Методом последовательного разведения ацетонитрилом стандартного раствора № 2 готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,0; 1,0; 0,4; и 0,2 мкг/см^3 и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы.

Методом последовательного разведения ацетоном стандартного раствора № 2 готовят растворы, содержащие по 2,0; 1,0; 0,4 и 0,2 мкг/см^3 и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы зерна и масла.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации Тиенкарбазон-метила 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. 9.6. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

7.4. Подготовка колонки с окисью алюминия для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения Тиенкарбазон-метила 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 Тиенкарбазон-метила на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 $см^3$ вносят 1 $см^3$ стандартного раствора Тиенкарбазон-метила 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. Исходную колбу обмывают пятью порциями смеси ацетонитрила с 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 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 Тиенкарбазон-метил, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

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

7.5. Подготовка концентрирующих патронов Диапак Диол для очистки экстрактов и проверка хроматографического поведения Тиенкарбазон-метила на них

7.5.1. Подготовка концентрирующих патронов Диапак Диол для очистки экстракта

Все процедуры происходят с использованием вакуума, скорость потока растворов через патрон не должна превышать 5 $см^3$/мин (1—2 кап./с).

Патрон Диапак Диол 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 гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 $см^3$ гексана. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения Тиенкарбазон-метила на концентрирующих патронах Диапак Диол

Из стандартного раствора Тиенкарбазон-метила в ацетонитриле, содержащего 1 мкг/$см^3$, отбирают 1 $см^3$, помещают в концентратор объемом 100 $см^3$ и выпаривают на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе досуха при температуре не выше 30 °С, сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 $мм^3$ хроматографируют. Исходный концентратор обмывают последовательно 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 2, затем тремя порциями 1 %-й уксусной кислоты в этилацетате объемом 10 $см^3$ каждая и последовательно вносят их на патрон.

Элюат после прохождения каждой порции элюентов собирают в отдельные концентраторы объемом по 100 $см^3$, выпаривают 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 $мм^3$ хроматографируют.

Определяют фракции, содержащие Тиенкарбазон-метил, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюента.

Изучение поведения Тиенкарбазон-метила на концентрирующих патронах Диапак Диол проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

7.6. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Symmetry Shield RP18 с предколонкой Zorbax Eclipse XDB-C8 устанавливают в термостате хроматографа и

стабилизируют при температуре 30 °С и скорости потока подвижной фазы 1 $см^3$/мин 3—4 ч.

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 17.4.3.01—83 «Почвы. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 28168—89 «Почвы. Отбор проб», ГОСТ 13586.3—83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 10852—86 «Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 8808—2000 «Масло кукурузы, ТУ» и ГОСТ 5471—83 «Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб».

Пробы воды хранят в стеклянной герметично закрытой таре в холодильнике при температуре 4 °С; пробы почвы – в полиэтиленовой таре в морозильнике при температуре –18 °С.

Для длительного хранения пробы почвы подсушивают при комнатной температуре в отсутствие прямого солнечного света. Сухие почвенные образцы могут храниться в темной таре в течение года. Перед анализом сухую почву просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Зеленую массу кукурузы хранят в морозильной камере при температуре –18 °С.

Отобранные пробы зерна кукурузы подсушивают до стандартной влажности и хранят в бумажных или тканевых мешочках в сухом, хорошо проветриваемом шкафу, недоступном для грызунов. Перед анализом пробы зерна кукурузы измельчают на лабораторной мельнице

Пробы кукурузного масла хранят в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 0—4 °С.

9. Подготовка проб и выполнение измерений

Анализ образцов должен быть выполнен в течение одного дня.

9.1. Вода

9.1.1. Экстракция

Пробу воды объемом 100 $см^3$ помещают в делительную воронку объемом 250 $см^3$, прибавляют туда 5 г хлористого натрия и 1 $см^3$ 6 М раствора соляной кислоты (до pH 6), перемешивают до полного растворения соли. Тиенкарбазон-метил экстрагируют тремя порциями хлори-

стого метилена объемом по 30 см^3, встряхивая каждый раз делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) объединяют в концентраторе объемом 250 см^3, собирая его через слой безводного сульфата натрия. Хлористый метилен выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

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

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция и очистка полученного экстракта

Пробу почвы весом 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 см^3, прибавляют туда 10 см^3 воды и выдерживают 10 мин при комнатной температуре. Тиенкарбазон-метил экстрагируют 50 см^3 ацетонитрила в течение 5 мин в ультразвуковой ванне. Затем пробу центрифугируют в течение 5 мин на скорости 4 000 оборотов в минуту. Супернатант фильтруют в делительную воронку объемом 250 см^3 через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 см^3 ацетонитрила и помещая каждый раз на 5 мин в ультразвуковую ванну. Пробы центрифугируют, экстракты фильтруют и объединяют в делительной воронке объемом 250 см^3.

К ацетонитрильному экстракту прибавляют 50 см^3 гексана и встряхивают делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (гексан) отбрасывают, а нижний слой (ацетонитрил) возвращают в делительную воронку и повторяют процедуру еще раз, используя 50 см^3 гексана. Нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор объемом 250 см^3, пропуская его 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 5 см^3 ацетона, обмывая стенки колбы, затем прибавляют 50 см^3 щелочного буфера pH 9, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 см^3. Полученную водную фракцию промывают двумя порциями хлористого метилена по 30 см^3, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) отбрасывают, а вод-

ную фракцию переносят в чистую делительную воронку и доводят pH раствора до значения 3,5 с помощью 6 М HCl.

Тиенкарбазон-метил экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 20 $см^3$, встряхивая делительную воронку каждый раз по 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой (хлористый метилен) собирают в концентратор объемом 250 $см^3$, пропуская его через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха при температуре не выше 30 °С.

9.2.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Диол

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2, растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на подготовленный патрон. Элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают последовательно 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 1, затем 10 $см^3$ смеси гексана с этилацетатом в соотношении 1 : 2, элюаты также отбрасывают. Тиенкарбазон-метил элюируют 20 $см^3$ 1 % уксусной кислоты в этилацетате. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, выпаривают 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.

9.3. Зеленая масса кукурузы

9.3.1. Экстракция

Образец измельченной зеленой массы кукурузы массой 10 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции объемом 250 $см^3$, прибавляют 75 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ ацетонитрила и помещая на 5 мин в ультразвуковую ванну, а затем на 5 мин на аппарат для встряхивания проб. Экстракты объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$ и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.3.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Сухой остаток, полученный по п. 9.3.1, растворяют в 5 $см^3$ ацетона и проводят очистку экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, как указано в п. 9.2.2.

9.3.3. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Диол

Сухой остаток, полученный по п. 9.3.2, растворяют в 2 $см^3$ этилацетата, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 8 $см^3$ гексана, перемешивают и проводят очистку экстракта на концентрирующих патронах Диапак Диол, как указано в п. 9.2.3.

9.3.4. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный в п. 9.3.3, растворяют в 10 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки концентратора, наносят на подготовленную колонку, элюат отбрасывают. Тиенкарбазон-метил элюируют 40 $см^3$ смеси ацетонитрила с уксусной кислотой в соотношении 99 : 1. Элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$, выпаривают 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.

9.4. Зерно кукурузы

9.4.1. Экстракция

Образец измельченного зерна кукурузы массой 20 г помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 $см^3$, прибавляют 50 $см^3$ ацетонитрила и помещают на 5 мин в ультразвуковую ванну. Затем пробу центрифугируют в течение 5 мин на скорости 4 000 оборотов в минуту. Экстракт фильтруют в концентратор объемом 250 $см^3$ через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ ацетонитрила и помещая на 5 мин в ультразвуковую ванну. Пробы центрифугируют, экстракты фильтруют и объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$, выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.2 «Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей», по п. 9.2.3 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Диол» и по п. 9.3.4 «Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия».

После очистки элюат выпаривают 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.

9.5. Масло кукурузы

9.5.1. Экстракция и очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Из пробы кукурузного масла отбирают в стакан навеску массой 20 г и переносят ее в делительную воронку объемом 250 $см^3$ тремя порциями гексана объемом по 30 $см^3$. Тиенкарбазон-метил экстрагируют тремя порциями ацетонитрила объемом по 30 $см^3$, встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний ацетонитрильный слой сливают в коническую колбу объемом 100 $см^3$. Верхний слой (гексан) отбрасывают.

Ацетонитрильный экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$ и промывают одной порцией гексана объемом 100 $см^3$, встряхивая делительную воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний ацетонитрильный слой собирают в концентратор объемом 250 $см^3$ через слой безводного сульфата натрия и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Далее проводят очистку экстракта на концентрирующих патронах Диапак Диол, как указано в п. 9.2.3 «Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак Диол».

После очистки элюат выпаривают 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.

9.6. Условия хроматографирования

Хроматограф жидкостной Agilent 1200 LCMS с диодно-матричным детектором G1315B с изменяемой длиной волны, снабженный термостатом для колонок с диапазоном температур от 15 до 80 °С и стандартным автосамплером для автоматического ввода пробы в хроматографическую систему (1200 Series Autosampler с дозирующим объемом от 0,1 до 100 $мм^3$).

Колонка стальная Symmetry Shield RP18, 250 мм × 4,6 мм, зернение 5 мкм, фирма «Waters».

Предколонка стальная Zorbax Eclipse XDB-C8, 12,5 мм × 2,1 мм, зернение 5 мкм, фирма «Agilent».

Температура колонки: 30 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил–вода–муравьиная кислота в соотношении 400 : 550 : 1.

Длина волны: 240 нм.

Время удерживания Тиенкарбазон-метила: 7,974 мин ± 3 %.

Чувствительность не менее 10 mAU (миллиединиц 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 программное обеспечение химического анализа Agilent Technologies ChemStation for LC 3D.

Альтернативная обработка результатов.

Содержание Тиенкарбазон-метила рассчитывают по формуле:

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

X – содержание Тиенкарбазон-метила в пробе, мг/кг или мг/дм^3;

$S_{ст}$ – 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 (см^3);

P – содержание Тиенкарбазон-метила 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):

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

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 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:

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

$\pm \Delta_{л,\bar{О}}$ ($\pm \Delta_{л,\bar{О}'}$) – 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 К рассчитывают по формуле:

$$\hat{E} = \sqrt{\Delta^2_{\ddot{e},\tilde{O}'} + \Delta^2_{\ddot{e},\tilde{O}}}$$

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 двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости (R):

$$\frac{2 \cdot \left|\tilde{O}_1 - \tilde{O}_2\right| \cdot 100}{(\tilde{O}_1 + \tilde{O}_2)} \le R \text{ , где} \qquad (3)$$

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

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

14. 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, Щербинкина Е. Н., инженер.

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: (499) 976-37-68, факс: (499) 976-43-26.

gost.e-ecolog.ru