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 Биксафена в воде, почве, зерне и соломе зерновых культур методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

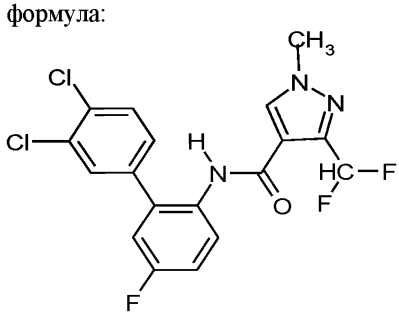
Методические указания
МУК 4.1.2903—11

Свидетельство о метрологической аттестации от 08.12.2010 № 0066.03.12.10.

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовой концентрации Биксафена в воде в диапазоне 0,005—0,050 мг/дм^3 и в почве в диапазоне 0,01—0,10 мг/кг, а также уровня остаточных количеств в зерне зерновых культур в диапазоне 0,01—0,10 мг/кг и в соломе зерновых культур в диапазоне 0,02—0,20 мг/кг.

Название действующего вещества по ИЮПАК: *N*-(3',4'-дихлоро-5-флуробифенил-2-ил)-3-(дифлурометил)-1-метил-1*H*-пиразол-4-карбоксоамид.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{18}H_{12}Cl_2F_3N_3O$.

Молекулярная масса: 414,21.

Агрегатное состояние: порошок.

Цвет, запах: белый, без запаха.

Давление паров: $4{,}6 \times 10^{-9}$ Па (при 20 и при 40 °С).

Температура плавления: 146,6 °С.

Температура кипения: разлагается при 250 °С.

Коэффициент распределения октанол–вода (при 40 °С): K_{ow} logP = 3,3.

Растворимость в воде, мг/дм^3 (20 °С): 0,49.

Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, 20 °С): этилацетат – 82; ацетон – более 250; дихлорметан – 102; метанол – 32; n-гептан – 0,056; диметилсульфоксид – более 250.

Биксафен не подвергается гидролизу при pH 4, 7, 9 в течение 5 дней при температуре 50 °С.

Краткая токсикологическая характеристика. Биксафен относится к веществам малоопасным по острой пероральной ($ЛД_{50}$ для крыс более 5 000 мг/кг) и дермальной токсичности ($ЛД_{50}$ для крыс более 2 000 мг/кг). Раздражает кожу кролика с полным восстановлением через 7 дней и слизистую оболочку глаз кролика с полным восстановлением через 14 дней.

Область применения. Биксафен – специфичный фунгицид против септориоза и ржавчины с длительным защитным действием. Относится к классу карбоксамидов и обладает локо-системным действием, подавляет прорастание спор и развитие мицелия. На биохимическом уровне ингибирует энзим сукцинат дегидрогиназу митохондриального респираторного канала.

Проходит регистрационные испытания в качестве фунгицида против большинства болезней, вызываемых грибами классов Аскомицеты, Базидиомицеты и Дейтеромицеты, на яровых и озимых зерновых с нормой расхода 0,8—1,0 л/га.

МДУ Биксафена (в импортируемой продукции): зерно пшеницы и ржи – 0,05 мг/кг, зерно ячменя и овса – 0,50 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 Биксафена

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	1,15	3,20	3,81
	0,01—0,05 вкл.	30	0,81	2,25	2,68
Почва	0,01—0,1 вкл.	50	1,22	3,39	4,03
Зерно пшеницы	0,01—0,1 вкл.	50	2,03	5,64	6,72
Солома пшеницы	0,02—0,1 вкл.	50	0,88	2,45	2,91
	0,1—0,2 вкл.	25	1,17	3,25	3,87

Таблица 2.

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

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	94,45	1,76	0,78
Почва	0,01	0,01—0,10	83,46	2,18	0,85
Зерно пшеницы	0,01	0,01—0,10	82,35	2,34	0,90
Солома пшеницы	0,02	0,02—0,2	75,96	2,36	0,84

2. Метод измерений

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

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
Микрошприц для жидкостной хроматографии, объем 100 $мм^3$, фирма «Hamilton», кат. № 80665	
Пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0 $см^3$	ГОСТ 29227—91
pH-метр/милливольтметр pH-150 0…14 pH; ± 1 999 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	
Хроматограф жидкостный Waters 515 с ультрафиолетовым детектором с изменяемой длиной волны и чувствительностью не ниже 0,005 единиц адсорбции на шкалу, номер госрегистрации № 15311-02	
Цилиндры мерные на 10, 25 и 50 $см^3$	ГОСТ 1770—74

Допускается использование средств измерений с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Биксафен, CAS 581809-46-3, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества не менее 98,9 %, 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
Кальций хлористый, ч	ТУ 6-09-4711—81
Концентрирующие патроны Диапак С (0,6 г), фирма «БиоХимМак СТ»	ТУ 4215-002-05451931—94
Кислота соляная, хч, ГОСТ 857—95	
Кислота муравьиная, чда	ГОСТ 5848—73
Метилен хлористый, хч	ТУ 6-09-2662—77
Натрий серно-кислый, безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233—77

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 Амин и Диапак С 16	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 OLSZTYN 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 $см^3$ и 4 000 $см^3$ ТС	ТУ 92-891.029—91
Колонка хроматографическая стальная Zorbax Eclipce XDB-C18, длиной 150 мм, с внутренним диаметром 4,6 мм, зернение 5 мкм, фирма «Agilent»	
Насос диафрагменный FT.19 фирмы KNF Neu Laboport	
Предколонка хроматографическая стальная, Zorbax Eclipce 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 С для очистки экстракта, проверка хроматографического поведения вещества на колонках с окисью алюминия и на концентрирующих патронах Диапак С, установление градуировочной характеристики.

7.1. Подготовка органических растворителей

7.1.1. 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.

7.1.2. 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.

7.1.3. Приготовление бидистиллированной воды

Дистиллят 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 $г/дм^3$ 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.

7.2. 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 550 $см^3$ ацетонитрила, 450 $см^3$ 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 градуировочных растворов

7.2.2.1. Стандартный раствор № 1 с концентрацией Биксафена 1,0 $мг/см^3$.

Взвешивают 50 мг Биксафена 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.

7.2.2.2. Стандартный раствор № 2 с концентрацией Биксафена 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.

7.2.2.3. Стандартный раствор № 3 с концентрацией Биксафена 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 установления градуировочной характеристики.

7.2.2.4. Стандартный раствор № 4 с концентрацией Биксафена 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 установления градуировочной характеристики.

7.2.2.5. Стандартный раствор № 5 с концентрацией Биксафена 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 установления градуировочной характеристики.

7.2.2.6. Стандартный раствор № 6 с концентрацией Биксафена 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 установления градуировочной характеристики.

7.2.2.7. Стандартные растворы Биксафена с концентрацией 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,4; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 для внесения в образцы.

Методом последовательного разведения ацетонитрилом готовят растворы, содержащие по 5,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,4; 0,2 и 0,1 мкг/см^3 и используют эти растворы для внесения в контрольные образцы.

7.2.3. 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 550 см^3 ацетонитрила, 450 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.

7.3. Построение калибровочной кривой

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади (высоты) пика от концентрации Биксафена 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 Биксафена 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 Биксафена на колонке с окисью алюминия

В концентратор объемом 100 $см^3$ вносят 1 $см^3$ стандартного раствора Биксафена 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 еще двумя порциями ацетонитрила объемом по 10 $см^3$ каждая и последовательно вносят их на колонку. Каждую порцию собирают отдельно в концентраторы 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 Биксафен, полноту смывания с колонки и необходимый объём элюата.

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

7.5. Подготовка концентрирующих патронов Диапак С для очистки экстракта и проверка хроматографического поведения Биксафена на них

7.5.1. Подготовка концентрирующих патронов Диапак С для очистки экстракта

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

Патрон Диапак С 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 ацетоном в соотношении 4 : 1, затем 10 $см^3$ гексана. Элюаты отбрасывают.

Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.5.2. Проверка хроматографического поведения Биксафена на концентрирующих патронах Диапак С

Из стандартного раствора Биксафена 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 1 $см^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на патрон. Элюат собирают в концентратор объемом по 100 $см^3$, выпаривают 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 $мм^3$ пробы вводят в хроматограф.

Исходный концентратор обмывают сначала 10 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 9 : 1, затем двумя порциями по 10 $см^3$ смеси гексана с ацетоном в соотношении 4 : 1 и вносят полученные растворы последовательно 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 хроматографируют.

Определяют фракции, содержащие Биксафен, полноту смывания с патрона и необходимый объём элюента.

Изучение поведения Биксафен на концентрирующих патронах Диапак С проводят каждый раз при отработке методики или поступлении новой партии концентрирующих патронов.

7.6. Подготовка и кондиционирование колонки для жидкостной хроматографии

Хроматографическую колонку Zorbax Eclipce XDB-C18 с предколонкой Zorbax Eclipce 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 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 Р 50436—92 (ИСО 950—79) «Зерновые. Отбор проб зерна», ГОСТ 27262—87 «Корма растительного происхождения. 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.

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

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.

9. Подготовка проб и выполнение измерений

9.1. Вода

9.1.1. Экстракция

Пробу воды объемом 100 $см^3$ помещают в делительную воронку объемом 250 $см^3$, прибавляют туда 10 г хлористого натрия, 1 $см^3$ 6 М соляной кислоты (до pH 1) и перемешивают до полного растворения соли. Биксафен экстрагируют тремя порциями хлористого 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. Экстракт 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 $мм^3$ раствора вводят в хроматограф.

9.2. Почва, зерно и солома зерновых

9.2.1. Экстракция и очистка полученного экстракта

Пробу почвы (или измельченного зерна) весом 20 г (5 г для соломы) помещают в полипропиленовую банку для экстракции и центрифугирования объемом 200 $см^3$, прибавляют туда 10 $см^3$ дистиллированной воды и выдерживают 5 мин при комнатной температуре. Биксафен экстрагируют 50 $см^3$ ацетонитрила в течение 5 мин в ультразвуковой ванне и дополнительно 5 мин на аппарате для встряхивания проб. Затем пробу центрифугируют в течение 5 мин при скорости 4 000 оборотов в минуту. Супернатант фильтруют через фильтр «красная лента» в делительную воронку объемом 250 $см^3$. Экстракцию повторяют еще два раза, используя по 50 $см^3$ ацетонитрила и помещая каждый раз на 5 мин в ультразвуковую ванну и дополнительно на 5 мин на аппарате для встряхивания проб. Пробы центрифугируют в течение 5 мин при скорости 4 000 оборотов в минуту, супернатант фильтруют. Экстракты объединяют в делительной воронке объемом 250 $см^3$.

К полученному экстракту добавляют 50 $см^3$ гексана и интенсивно встряхивают воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке верхний слой (гексан) отбрасывают, а ацетонитрильный экстракт возвращают в делительную воронку и промывают еще одной порцией гексана объемом по 50 $см^3$. Гексан отбрасывают, а ацетонитрил 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.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

К сухому остатку в концентраторе, полученному в п. 9.2.1, прибавляют 5 $см^3$ ацетонитрила, обмывают стенки концентратора, добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают и переносят в делительную воронку объемом 250 $см^3$. Туда же прибавляют 10 г сухого хлорида натрия и интенсивно перемешивают до полного растворения соли. Биксафен экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 30 $см^3$, каждый раз интенсивно встряхивая воронку 2 мин. После полного разделения фаз в делительной воронке нижний слой хлористого метилена объединяют в концентраторе объемом 250 $см^3$, собирая его

через слой безводного сульфата натрия, и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с окисью алюминия

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2, растворяют в 10 $см^3$ ацетонитрила, тщательно обмывают стенки концентратора, наносят на заранее подготовленную колонку, элюат собирают в концентратор. Исходную колбу обмывают 10 $см^3$ ацетонитрила и вносят на колонку. Элюаты объединяют и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

9.2.4. Очистка экстракта на концентрирующих патронах Диапак С

Сухой остаток, полученный в п. 9.2.4, растворяют в 1 $см^3$ ацетона, тщательно обмывая стенки концентратора, прибавляют 9 $см^3$ гексана, перемешивают и вносят на заранее подготовленный концентрирующий патрон Диапак С, элюат отбрасывают. Исходный концентратор обмывают 10 $см^3$ смеси ацетона с гексаном в соотношении 1 : 9, элюат отбрасывают. Биксафен элюируют 10 $см^3$ смеси ацетона с гексаном в соотношении 1 : 4, элюат собирают в концентратор объемом 100 $см^3$ и выпаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С.

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ (почва, зерно) и в 1 $см^3$ (солома) смеси ацетонитрила с водой в соотношении 1 : 1 и 20 $мм^3$ раствора вводят в хроматограф.

9.3. Условия хроматографирования

Хроматограф жидкостный 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 Zorbax Eclipce XDB-C18, 150 мм × 4,6 мм, зернение 5 мкм, фирма «Agilent».

Предколонка стальная Zorbax Eclipce 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 550 : 450 : 1.

Длина волны: 250 нм.

Время удерживания Биксафена: 8,405 ± 3 % мин.

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 Биксафена рассчитывают по формуле:

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

X – содержание Биксафена 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 (см^3);

P – содержание Биксафена 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:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 K рассчитывают по формуле:

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

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 им. 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