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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств хлороталонила в персиках, хлороталонила и его метаболита 4-гидрокси-2,5,6-трихлоризофталонитрила (SDS-3701) в сельдерее (корень) методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3122—13

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств хлороталонила в персиках, хлороталонила и его метаболита 4-гидрокси-2,5,6-трихлоризофталонитрила (SDS-3701) в сельдерее (корень) методом капиллярной газожидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.—22 с.

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана Роспотребнадзора (В. Н. Ракитский, Т. В. Юдина, М. В. Ларькина, С. К. Рогачева).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 29 октября 2013 г. № 3).

3. Утверждены врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации А. Ю. Поповой 30 октября 2013 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

© Роспотребнадзор, 2014
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014

УТВЕРЖДАЮ
Врио руководителя Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главного государственного санитарного
врача Российской Федерации
А. Ю. Попова
30 октября 2013 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств хлороталонила в персиках, хлороталонила и его метаболита 4-гидрокси-2,5,6-трихлоризофталонитрила (SDS-3701) в сельдерее (корень) методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3122—13

Свидетельство об аттестации МВИ № 01.00282-2008/0172.11.06.13 от 11.06.13.

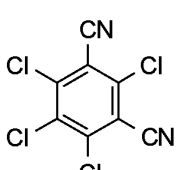
Настоящие методические указания устанавливают порядок применения метода капиллярной газожидкостной хроматографии для определения массовых концентраций хлороталонила в персиках, хлороталонила и его метаболита 4-гидрокси-2,5,6-трихлоризофталонитрила (SDS-3701) в сельдерее (корень) в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг.

Методические указания носят рекомендательный характер.

Название действующего вещества по ИСО: хлороталонил.

Название действующего вещества по ИЮПАК: тетрахлороизофталонитрил.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_8Cl_4N_2$.

Молекулярная масса: 265,9.

Кристаллическое вещество без запаха, белого цвета. Температура плавления 252,1 °С. Давление паров при 25 °С: 0,076 мПа (25 °С). Растворимость в органических растворителях (г/дм^3, 25 °С): ксилол – 80; циклогексан, диметилформамид – 30; ацетон – 20; керосин < 10; вода – 0,81. Является термически и химически стойким соединением, стабилен в кислых и слабощелочных растворах; слабо гидролизуется при pH > 9.

Краткая токсикологическая характеристика

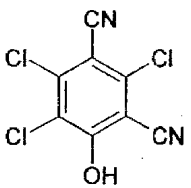
Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов > 10 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 4,7 мг/дм^3 (4 ч).

Область применения препарата

Хлороталонил – контактный фунгицид защитного действия, препятствует прорастанию спор и конидий, не специфично связывая тиольные группы аминокислот, протеинов и пептидов, нарушая функции гликолитических и дыхательных ферментов и клеток.

Метаболит хлороталонила SDS-3701 (R 182281) – 4-гидрокси-2,5,6-трихлороизофталонитрил является основным метаболитом хлороталонила в растениях и организме животных. По физико-химическим свойствам близок к основному веществу, но отличается большей полярностью и меньшей стойкостью.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_8Cl_3N_2OH$.

Молекулярная масса: 247,4.

1. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и её составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$ не превышает значений, приведенных в табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций (мг/кг)	Показатель точности (граница относительной погрешности), %, $P = 0,95$	Показатель повторяемости (стандартное отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости, σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений, r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях, R, %
Хлороталонил						
Персики	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	4,3	6,0	12	18
Корень сельдерея	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	4,7	6,6	13	19
Метаболит SDS-3701 (R182281)						
Корень сельдерея	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	4,5	6,3	13	19

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для всего диапазона измерений ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 2

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 20$				
	предел обнаружения, мг/кг	диапазон определяемых концентраций, мг/кг	полнота извлечения вещества, %	стандартное отклонение, %	доверительный интервал среднего результата, ±, %
Хлороталонил					
Персики	0,01	0,01—0,1	92,93	4,5	2,4
Корень сельдерея	0,01	0,01—0,1	86,12	4,5	2,4
Метаболит SDS-3701 (R182281)					
Корень сельдерея	0,01	0,01—0,1	87,50	4,3	2,3

2. Метод измерений

Метод основан на определении хлороталонила и его метаболита SDS-3701 (R182281) методом газожидкостной хроматографии с использованием детектора по захвату электронов (ЭЗД) после их экстракции из объектов анализа органическим растворителем, очистке экстракта от коэкстрактивных компонентов перераспределением в системе несмешивающихся растворителей, далее на колонке с флорисилом. Газохроматографическому измерению метаболита предшествует стадия дериватизации вещества в метиловый эфир. Обработка хроматограмм методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Газовый хроматограф, снабженный электроноозахватным детектором с пределом детектирования по линдану $5 \cdot 10^{-14}$ г/с и автоматическим пробоотборником, предназначенный для работы с капиллярной колонкой	
Барометр-анероид с диапазоном измерения атмосферного давления 5—790 мм рт. ст. и пределом допустимой погрешности (1 ± 2,5) мм рт. ст.	ТУ 2504-1799—75
Весы аналитические с пределом взвешивания 110 г и пределом допустимой погрешности 0,001 г	ГОСТ Р 53228—08
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г и пределом допустимой погрешности ± 0,01 г	ГОСТ Р 53228—08
Колбы мерные 2-100-2 вместимостью 100 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ OIML R 111-1—09
Микропипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 0,1 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Микрошприц вместимостью 10 $мм^3$	
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0 и 10 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Хлороталонил, аналитический стандарт с содержанием основного компонента 99,1 %	
Метаболит SDS-3701 (R182281), аналитический стандарт с содержанием основного компонента 100 %	
Азот газообразный нулевой, (99,999 %) в баллонах	ТУ 6-21-39—96
Ацетон, осч	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил, осч	ТУ 6-09-14-2167—84
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистилированная)	ГОСТ Р 52501—05
н-Гексан (гексан), хч	ТУ 6-09-06-657—84
Калия гидроокись (гидроксид калия), хч	ГОСТ 24363—80
Калий марганцово-кислый (перманганат калия), хч	ГОСТ 20490—75
Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч	ГОСТ 4221—76
Кальций хлористый (хлорид кальция), насыщенный водный раствор	ГОСТ 450—77
Кислота серная концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Кислота соляная (хлороводородная), хч	ГОСТ 3118—77
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794
Метиламин гидрохлорид, ч	ТУ 6-09-3755—74
Мочевина, чда	ГОСТ 6691—77
Натрий серно-кислый (сульфат натрия) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый (карбонат натрия), хч	ГОСТ 83—79
Натрий хлористый (хлорид натрия), хч	ГОСТ 4233—77
Натрий азотисто-кислый (нитрит натрия), хч	ГОСТ 4197—74
Пропанол-1 (н-пропанол), хч	ТУ 6-09-4344—77
Силикагель для колоночной хроматографии (0,200—0,500 мм, 40 А)	
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора)	ТУ 6-09-7173—85
Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), хч	ГОСТ 22300—76
Эфир диэтиловый (этиловый эфир), чда	ТУ 2600-001-43852015—02

Примечание. Допускается использование реактивов с более высокой квалификацией, не требующей дополнительной очистки растворителей.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания	ТУ 64-1-2851—78
Баня водяная	
Баня ультразвуковая с рабочей частотой 35 кГц	
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %	ТУ 25-11-1645—84
Бумажные фильтры средней и высокой плотности	ТУ 2642-001-05015242—07
Бумага индикаторная универсальная pH 1—10	ТУ6-09-118189
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронки делительные вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Воронки конусные диаметром 40—45 мм	ГОСТ 25336—82
Груша резиновая	ТУ9398-005-0576-9082—03
Гомогенизатор бытовой	
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колбы плоскодонные вместимостью 100, 250, 400—500 $см^3$	ГОСТ 9737—93
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 10, 100, 150 и 250 $см^3$ (концентратор)	ГОСТ 9737—93
Колонка стеклянная для препаративной хроматографии длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм	
Мешалка магнитная	
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 25336—82
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	
Ротационный вакуумный испаритель с мембранным насосом, обеспечивающий вакуум до 10 мбар	
Стаканы химические с носиком вместимостью 100, 150 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336—82
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Установка для перегонки растворителей	
Флорисил, для колоночной хроматографии	
Хроматографическая капиллярная кварцевая колонка длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, содержащая сорбент: 50 % – фенилполисилоксана, 50 % – диметилполисилоксана (толщина пленки сорбента 0,25 мкм)	

Примечание. Допускается применение вспомогательных устройств и материалов 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 по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ Р 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на газовый 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 нормы, установленные ГН 2.2.5.1313—03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» и ГН 2.2.5.2308—07 «Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

4.3. При работе с газами, находящимися в баллонах под давлением до 15 МПа (150 кгс/см^2), необходимо соблюдать «Правила устройства и безопасной эксплуатации стационарных компрессорных установок, воздухопроводов и газопроводов под давлением», ПБ-03-576-03. Запрещается открывать вентиль баллона, не установив на нем понижающий редуктор.

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений допускают специалиста, прошедшего обучение, освоившего методику, владеющего техникой, имеющего опыт работы на газовом хроматографе и подтвердившего соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;
- выполнение измерений на газовом хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), получение N-нитрозо-N-метилмочевины (при необходимости), раствора диазометана, приготовление растворов и градуировочных растворов, растворов внесения,

установление градуировочных характеристик, приготовление смесей растворителей для экстракции и очистки экстрактов на колонке, подготовка колонки с флорисилом, проверка хроматографического поведения хлороталонила и его метаболита на ней.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетон

Ацетон перегоняют над небольшим количеством марганцево-кислого калия и прокаленным карбонатом калия или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30.

7.1.2. н-Гексан

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты, до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.3. Этилацетат

7.1.3.1. Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %. Навеску (25 ± 0,1) г натрия углекислого помещают в мерную колбу вместимостью 500 см^3, растворяют в бидистиллированной воде, доводят водой до метки, перемешивают.

7.1.3.2. Очистка растворителя. Этилацетат промывают последовательно 5 %-м водным раствором натрия углекислого, насыщенным раствором хлористого кальция, сушат над прокаленным карбонатом калия и перегоняют или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30.

7.1.4. Ацетонитрил

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора не менее 1 ч, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.2. Получение N-нитрозо-N-метилмочевины

В отсутствии готового препарата нитрозометилмочевины осуществляют его синтез.

Все работы необходимо проводить в вытяжном шкафу!

В круглодонную колбу на шлифе вместимостью 1 дм^3, снабженную обратным холодильником, помещают 80 г метиламина гидрохлорида и

300 г мочевины, растворяют содержимое в 400 $см^3$ воды и кипятят 3 ч с обратным холодильником на водяной бане. Раствор в колбе охлаждают до комнатной температуры и добавляют в него 110 г нитрита натрия, охлаждают в бане со льдом, содержащим хлорид натрия, до 0 °С и медленно при перемешивании вливают в смесь 600 г льда и 60 $см^3$ концентрированной серной кислоты, помещенную в стакан вместимостью 2 $дм^3$, охлаждаемый снаружи смесью льда с хлоридом натрия. Выпавшие кристаллы нитрозометилмочевины немедленно отфильтровывают на воронке Бюхнера, хорошо отсасывают под вакуумом и промывают на фильтре ледяной водой.

Примечание. Нитрозометилмочевину хранят в темной склянке в холодильнике, так как под действием света и тепла она может взорваться.

7.3. Получение раствора диазометана

Внимание! Диазометан взрывоопасен и очень ядовит. Все работы необходимо проводить в вытяжном шкафу!

В коническую колбу на 100 $см^3$ вносят 20 $см^3$ 40 %-го раствора гидроксида калия и 50 $см^3$ диэтилового эфира, колбу помещают в баню со льдом и охлаждают до температуры 2—5 °С. В охлажденную смесь порциями при перемешивании на магнитной мешалке или путем встряхивания вносят 5 г нитрозометилмочевины. Реакционную смесь выдерживают на холоду 10 мин. Затем эфирный слой сливают в чистую коническую колбу вместимостью 100 $см^3$, добавляют 10—15 гранул гидроксида калия и колбу оставляют в бане со льдом на 2,5—3,0 ч для осушения раствора.

Раствор диазометана в эфире годен к употреблению при хранении в холодильнике в течение 1—2 суток. **При хранении сосуды с диазометаном нельзя плотно закрывать!**

7.4. Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 % (5 %-й раствор)

Навеску (25 ± 0,1) г натрия углекислого помещают в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$, растворяют в деионизированной воде, доводят водой до метки, перемешивают.

7.5. Приготовление раствора соляной кислоты с концентрацией 0,1 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, содержащую 300—400 $см^3$ деионизованной воды, помещают 8,3 $см^3$ концентрированной соляной кислоты, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.6. Приготовление раствора серной кислоты с концентрацией 0,5 моль/дм^3 (0,5 М раствор)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 50—60 см^3 бидистиллированной воды, вносят 49 г концентрированной серной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

7.7. Приготовление раствора гидроксида калия с массовой долей 40 % (40 %-й раствор)

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают (20 ± 0,1) г гидроксида калия, растворяют в 25—30 см^3 дистиллированной воды, доводят водой до метки. Раствор хранят в емкости из полипропилена не более
1 месяца.

7.8. Приготовление градуировочных растворов хлороталонила и его метаболита SDS-3701 (R182281)

7.8.1. *Исходный раствор хлороталонила для градуировки (концентрация 500 мкг/см^3).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,05 г хлороталонила, растворяют в 50—70 см^3 ацетона, доводят до метки этим же растворителем, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.8.2. *Раствор № 1 хлороталонила для градуировки и внесения (концентрация 5,0 мкг/см^3).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1,0 см^3 исходного раствора хлороталонила для градуировки с концентрацией 500 мкг/см^3 (п. 7.8.1), доводят до метки ацетоном, тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.8.3. *Рабочие растворы № 2—5 хлороталонила для градуировки, серия 1 (концентрация 0,05—0,5 мкг/см^3).* В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0; 2,0; 4,0 и 10 см^3 раствора № 1 хлороталонила с концентрацией 5,0 мкг/см^3 (п. 7.8.2), доводят до метки ацетоном, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией хлороталонила 0,05; 0,1; 0,2 и 0,5 мкг/см^3 соответственно.

Растворы № 2—5 готовят непосредственно перед использованием.

7.8.4. *Исходный раствор метаболита хлороталонила SDS-3701 для градуировки (концентрация 500 мкг/см^3).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0,05 г *SDS-3701 (R182281)*, растворяют в 50—70 см^3 ацетона, доводят до метки этим же растворителем, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 6 месяцев.

7.8.5. *Исходный раствор метилового эфира SDS-3701 для градуировки (соответствует концентрации SDS-3701 5 мкг/см^3).*

В круглодонную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 1,0 см^3 исходного раствора вещества с концентрацией 500 мкг/см^3 (п. 7.8.4), растворитель отдувают потоком теплого воздуха, вносят 3 см^3 раствора диазометана, выдерживают 30 мин при комнатной температуре. Для освобождения от избытка диазометана вносят в колбу 0,1 г силикагеля, выдерживают еще 15 мин. Затем добавляют в колбу 0,1 см^3 н-пропанола, отдувают растворитель потоком теплого воздуха (не помещая колбу на подогретую водяную баню) до влажного остатка. Вносят в колбу 1 см^3 гексана и вновь отдувают растворитель до влажного остатка (отсутствие запаха эфира).

Остаток растворяют в ацетоне, перенося порциями растворителя по 10—15 см^3 в мерную колбу на 100 см^3, доводят объем до метки, перемешивают.

Раствор метилового эфира *SDS-3701* с концентрацией 5 мкг/см^3 хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение месяца.

7.8.6. *Рабочие растворы № 2—5 метилового эфира SDS-3701, серия 2, для градуировки (соответствует концентрации SDS-3701 0,05—0,5 мкг/см^3).* В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают по 1,0; 2,0, 4,0 и 10,0 см^3 исходного раствора метилового эфира *SDS-3701* (приготовленного по п. 7.8.5), доводят до метки гексаном, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией SDS-3701 0,05; 0,1; 0,2 и 0,5 мкг/см^3 соответственно.

Растворы хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение 2 недель.

7.8.7. *Раствор № 1 метаболита хлороталонила SDS-3701 для внесения (концентрация 5,0 мкг/см^3).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1,0 см^3 исходного раствора метаболита хлороталонила для градуировки с концентрацией 500 мкг/см^3 (п. 7.8.4), доводят до метки ацетоном, тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.9. Установление градуировочной характеристики хлороталонила и метаболита SDS-3701

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ · с) от концентрации хлороталонила и метаболита SDS-3701 в растворе (мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки № 2—5 (серии 1 и 2).

В испаритель газового хроматографа вводят по 1 мм^3 каждого градуировочного раствора, приготовленного по пп. 7.8.3 и 7.8.6 и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений. Устанавливают площади пиков хлороталонила и метаболита SDS-3701, на основании которых строят градуировочную зависимость.

7.10. Приготовление смесей и растворов для экстракции и очистки экстрактов на колонке

7.10.1. *Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 8 : 2).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 80 см^3 гексана и 20 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.10.2. *Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 9 : 1).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 90 см^3 гексана и 10 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.10.3. *Смесь гексан–этилацетат (объемное соотношение 95 : 5).* В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 95 см^3 гексана и 5 см^3 этилацетата, перемешивают.

7.11. Подготовка колонки с флорисилом

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 4 г флорисила в 20 см^3 гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента, на который помещают слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку последовательно промывают 20 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, затем 20 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 9 : 1 и 20 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 95 : 5 и 20 см^3 гексана, скорость прохождения растворителя 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

7.12. Проверка хроматографического поведения исследуемых веществ на колонке с флорисилом

7.12.1. Проверка хроматографического поведения хлороталонила

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 раствора № 1 хлороталонила для градуировки с концентрацией 5,0 мкг/см^3 (п. 7.8.2), упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 5 см^3 гексана, выдерживают на ультразвуковая бане в течение 60 с, далее наносят на колонку, подготовленную по п. 7.11. Колбу обмывают дважды этим

же растворителем, порциями по 5 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду.

Затем колонку промывают 20 см^3 гексана со скоростью 1—2 капли в секунду, 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (95 : 5, по объему), 30 см^3 смеси гексан–этилацетат (90 : 10, по объему). Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см^3 гексана, анализируют содержание хлороталонила по п. 9.5.

Фракции, содержащие хлороталонил, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

7.12.2. Проверка хроматографического поведения метаболита SDS-3701

В круглодонную колбу вместимостью 10 см^3 помещают 0,5 см^3 исходного раствора метилового эфира SDS-3701 для градуировки и внесения (соответствует концентрации метаболита SDS-3701 5 мкг/см^3) (п. 7.8.5), упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 3 см^3 гексана, выдерживают на ультразвуковой бане в течение 60 с, далее наносят на колонку, подготовленную по п. 7.11. Колбу обмывают дважды этим же растворителем, порциями по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду.

Затем колонку промывают 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (95 : 5, по объему), 20 см^3 смеси гексан–этилацетат (90 : 10, по объему), 30 см^3 смеси гексан–этилацетат (8 : 2, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду.

Фракционно (по 10 см^3) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см^3 гексана, анализируют содержание метаболита SDS-3701 по п. 9.5.

Фракции, содержащие метаболит SDS-3701, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

Примечание. Проверку хроматографического поведения веществ следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ: ГОСТ 21833—76 «Персики свежие. Технические условия» и «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Отобранные пробы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике в темноте не более 7 дней. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Перед анализом образцы измельчают с помощью гомогенизатора.

9. Выполнение определения

9.1. Персики

Измельченные образцы персиков массой 20 г вносят в коническую колбу на 250—300 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ ацетонитрила, интенсивно встряхивают вручную в течение 3 мин и помещают на аппарат для встряхивания на 30 мин, затем в течение 3 мин выдерживают на ультразвуковой бане.

Пробам дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной фильтр средней плотности в делительную воронку. В коническую колбу с пробой вносят новые порции экстрагента объемом 80 $см^3$ и повторно экстрагируют на аппарате для встряхивания в течение 15 мин, затем на ультразвуковой бане в течение 5 мин, после чего раствор фильтруют на воронке Бюхнера. Экстракты объединяют в делительной воронке.

Объединенный экстракт промывают двумя порциями гексана по 30 $см^3$, отбрасывая гексановую фракцию. Затем экстракт переносят в концентратор и упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 30 °С до водного остатка (около 5 $см^3$).

Добавляют в концентратор 100 $см^3$ дистиллированной воды, перемешивают содержимое, обмывая стенки концентратора и раствор переносят в чистую делительную воронку. Экстракцию хлороталонила проводят 40 $см^3$ дихлорметаном. После разделения фаз нижний дихлорметановый слой сливают в концентратор через слой безводного сульфата натрия.

Процедуру повторяют еще 2 раза, используя по 50 $см^3$ дихлорметана. Объединенные экстракты хлороталонила упаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Очищают по п. 9.3.

9.2. Корень сельдерея

Навеску измельченного корня сельдерея массой 20 г помещают в колбу объемом 250 см^3, добавляют 10 см^3 0,5 М раствора серной кислоты, 50 см^3 ацетонитрила. Смесь встряхивают на аппарате для встряхивания 30 мин. Экстракт отфильтровывают через бумажный фильтр средней плотности в концентратор емкостью 250 см^3.

Процедуру экстракции повторяют дважды, каждый раз используя 50 см^3 ацетонитрила и помещая экстракты в тот же концентратор. Объединенный экстракт упаривают на ротационном вакуумном испарителе до водного остатка при температуре не выше 30 °С.

В концентратор добавляют 5 %-й раствор натрия углекислого однозамещенного до pH 4—5, содержимое перемешивают и переносят в делительную воронку емкостью 250 см^3. Концентратор ополаскивают 100 см^3 дистиллированной воды, которую сливают в ту же делительную воронку. К содержимому воронки добавляют 10 г хлористого натрия и интенсивно встряхивают ее до растворения реактива.

Экстракцию хлороталонила и метаболита SDS-3701 проводят 40 см^3 дихлорметаном. После разделения фаз нижний дихлорметановый слой сливают в концентратор через слой безводного сульфата натрия.

Процедуру повторяют еще 2 раза, используя по 50 см^3 дихлорметана. Объединенные экстракты хлороталонила упаривают досуха при температуре не выше 30 °С. Очищают по п. 9.3.

9.3. Очистка экстрактов на колонке с флорисилом

Сухой остаток, полученный по п. 9.1 (персики) или 9.2 (корень сельдерея), находящийся в колбе для упаривания, растворяют в 3 см^3 гексана, выдерживают на ультразвуковой бане 60 с и наносят на колонку с флорисилом, подготовленную по п. 7.11. Колбу ополаскивают дважды порциями гексана по 3 см^3, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают пробу 20 см^3 гексана, 20 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 95 : 5, элюаты отбрасывают.

Хлороталонил элюируют с колонки 20 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 9 : 1 со скоростью 1—2 капли в секунду, собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 150 см^3.

При анализе образцов корня сельдерея метаболит SDS-3701 элюируют с колонки 30 см^3 смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 8 : 2, со скоростью 1—2 капли в секунду, собирая элюат во вторую круглодонную колбу вместимостью 150 см^3.

Растворы упаривают досуха при температуре не выше 35 °С. Сухой остаток в первой колбе растворяют в 2 $см^3$ гексана, помещают в ультразвуковую баню на 40—60 с и анализируют содержание хлороталонила по п. 9.5.

Сухой остаток во второй колбе подвергают дериватизации по п. 9.4.

9.4. Дериватизация метаболита SDS-3701 (R182281)

К сухому остатку, находящемуся во второй колбе (полученному по п. 9.2), добавляют 3 $см^3$ раствора диазометана, выдерживают 30 мин при комнатной температуре. Для освобождения от избытка диазометана вносят в колбу 0,1 г силикагеля, выдерживают еще 15 мин. Затем добавляют в колбу 0,1 $см^3$ н-пропанола, отдувают растворитель потоком теплого воздуха (не помещая колбу на подогретую водяную баню) до влажного остатка. Вносят в колбу 1 $см^3$ гексана и вновь отдувают растворитель (отсутствие запаха эфира).

Сухой остаток растворяют в 2 $см^3$ гексана, помещают в ультразвуковую баню на 40—60 с и анализируют содержание метаболита хлороталонила по п. 9.5.

9.5. Условия хроматографирования

Газовый хроматограф, снабженный электронозахватным детектором.

Хроматографическая, капиллярная, кварцевая колонка, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, содержащая сорбент: 50 % – фенилполисилоксан; 50 % – диметилполисилоксан (толщина пленки сорбента 0,25 мкм).

Температура: детектора 320 °С;
испарителя 250 °С.

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 120 °С, выдержка 1 мин, нагрев колонки со скоростью 5 градусов в минуту до температуры 200 °С, выдержка 4 мин, нагрев колонки со скоростью 25 градусов в минуту до температуры 270 °С.

Газ 1 (азот): давление 75 кПа, 35,974 см/с, поток 1,501 $см^3$/мин.

Газ 2 (азот): деление потока 1 : 3; сброс 6,9 $см^3$/мин.

Хроматографируемый объем: 1 $мм^3$.

Линейный диапазон детектирования: 0,05—0,5 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочные растворы с концентрацией 0,5 мкг/$см^3$, разбавляют ацетоном не более чем в 50 раз.

10. Обработка результатов анализа

10.1. Персики

Содержание хлороталонила в пробе персиков (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{\tilde{N}\text{Ч}V}{m}, \text{ где}$$

C – концентрация хлороталонила, найденная по градуировочной характеристике в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см^3;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;

m – масса анализируемого образца, г.

10.2. Корень сельдерея

Содержание хлороталонила с учетом его метаболита SDS-3701 в пробе корня сельдерея (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{(\grave{A} + \acute{A}\,\text{Ч}\hat{E})\text{Ч}V}{m}, \text{ где}$$

A, $Б$ – концентрации хлороталонила и метаболита SDS-3701, найденные по градуировочным графикам в соответствии с величинами площади хроматографических пиков, мкг/см^3;

K – коэффициент пересчета содержания метаболита SDS-3701 на эквивалент хлороталонила, по соотношению молекулярных масс (равен 1,07);

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см^3;

m – масса анализируемого образца, г.

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предел повторяемости:

$$\frac{2\text{Ч}|\tilde{O}_1 - \tilde{O}_2|\text{Ч}100}{(\tilde{O}_1 + \tilde{O}_2)} \text{ J } r, \text{ где} \qquad (1)$$

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;

r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8\sigma_r$.

При невыполнении условия (1) выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \tilde{O}}{100}, \text{ где}$$

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

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«*содержание хлороталонила и его метаболита в пробах персиков и корне сельдерея менее 0,01 мг/кг*».*

* – 0,01 мг/кг – предел обнаружения хлороталонила и его метаболита в пробах персиков и корне сельдерея.

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений 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.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале и по окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание веществ в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,05 до 0,5 мкг/см^3.

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

$$\hat{A} = \frac{(\tilde{O} - \tilde{N}) \text{Ч} 00}{\tilde{N}} \text{ J } \hat{A}, \text{ где}$$

X – концентрация веществ в пробе при контрольном измерении, мкг/см^3;

C – известная концентрация градуировочного раствора хлороталонила или его метаболита, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см^3;

B – норматив контроля погрешности градуировочной характеристики, % (B = 10 % при P = 0,95).

Если величина расхождения (A) превышает 10 %, 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 хлороталонила, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.9.

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:

$$\tilde{N}_d \text{ i } D_{\ddot{e},\tilde{O}} + D_{\ddot{e},\tilde{O}\ddot{y}}, \text{ где}$$

$\pm D_{\ddot{e},\tilde{O}}$ ($\pm D_{\ddot{e},\tilde{O}\ddot{y}}$) – 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:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot \tilde{O}}{100}, \text{ где}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности, табл. 1), %.

Контрольный параметр процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

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

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

$$\hat{E} = \sqrt{D^2_{\hat{e},\bar{o}\bar{y}} + D^2_{\hat{e},\bar{O}}}$$

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 условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предел воспроизводимости (R):

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

X_1, X_2 – результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг;

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

gost.e-ecolog.ru