Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Методические указания
МУК 4.1.2546—09

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

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

Методические указания
МУК 4.1.2546—09

ББК 51.21
О60

О60 **Определение** остаточных количеств форамсульфурона в воде, почве, зеленой массе,зерне и масле кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии:.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—19 с.

1. Разработаны Всероссийским Научно-исследовательским институтом фитопатологии (Микитюк О. Д., Назарова Т. А., Макеев А. М.).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно- эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 25 июня 2009 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 9 сентября 2009 г.

4. Введены в действие с 1 декабря 2009 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

1.Метрологическая характеристика метода....5
2. Метод измерений....7
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы....7
3.1. Средства измерений....7
3.2. Реактивы....8
3.3. Вспомогательные устройства, материалы....8
4. Требования безопасности....9
5. Требования к квалификации операторов....9
6. Условия измерений....9
7. Подготовка к выполнению измерений....10
7.1. Очистка органических растворителей....10
7.2. Приготовление 2 М и 0, 005 М растворов орто-фосфорной кислоты....10
7.3. Приготовление 0,1 М раствора $K_2HPO_4 \times 3H_2O$....11
7.4. Приготовление 0,06 М раствора $NaHCO_3$....11
7.5. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта....11
7.6. Проверка хроматографического поведения форамсульфурона на колонке с силикагелем....11
7.7. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ....12
7.8. Кондиционирование хроматографической колонки....12
7.9. Приготовление градуировочных растворов....12
7.10. Установление градуировочной характеристики....12
8. Отбор и хранение проб....13
9.Выполнение определения....13
9.1. Экстракция форамсульфурона....13
9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей....15
9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем....16
9.4. Условия хроматографирования....16
10. Обработка результатов анализа....16
11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений....17
12. Оформление результатов....17
13. Контроль качества результатов измерений....18
14. Разработчики....19

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
9 сентября 2009 г.
Дата введения: 1 декабря 2009 г

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

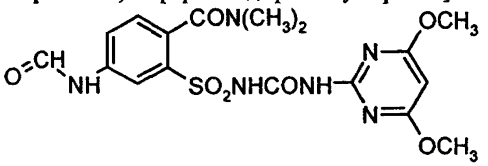
Определение остаточных количеств форамсульфурона в воде, почве, зеленой массе, зерне и масле кукурузы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.2546—09

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения остаточных количеств форамсульфурона в воде в диапазоне 0,001—0,01 мг/дм^3, в почве в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг, в зеленой массе кукурузы в диапазоне 0,05—0,5 мг/кг, в зерне и масле кукурузы в диапазоне 0,02—0,2 мг/кг.

Название вещества по ИСО: форамсульфурон

Название вещества по ИЮПАК: 1-(4,6-диметоксипиримидин-2-ил)-3-[2-(диметилкарбамоил)-5-формамидофенилсульфонил]мочевина



$C_{17}H_{20}N_6O_7S$.

Мол. масса: 452,4.

Светло-бежевое вещество. Температура плавления: 199,5 °С. Давление паров при 20 °С: 4,2 × 10^{-8} мПа. Коэффициент распределения н-октанол/вода при 20 °С: K_{ow} log P = 1,44 (pH 2), 0,603 (pH 5) , - 0,78

(pH 7) , - 1,97 (pH 9) , 0,60 (дистиллированная вода, pH 5,5—5,7). Растворимость (в г/дм^3 растворителя) при 20 °С: ацетон 1,925, ацетонитрил – 1,111, 1,2-дихлорэтан – 0,185, этилацетат – 0,362, гептан – <0 ,010, метанол – 1,66; вода – 0,04 (pH 5), 3,3 (pH 7), 94,6 (pH 8).

Фотолитически стабилен, нестабилен в кислой среде (DT_{50} = 10 дней при pH 5).

В биологически активных почвах в аэробных условиях форамсульфурон быстро разлагается со средним значением DT_{50} = 1,5—9,4 дней. Вещество и его метаболиты относительно слабо передвигаются по почвенному профилю.

Краткая токсикологическая характеристика.

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 5 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2 000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 5,04 мг/дм^3 воздуха. LC_{50} для рыб > 100 мг/дм^3 , EC_{50} для зеленых водорослей – 12,5 мг/дм^3.

В России установлены следующие гигиенические нормативы:

ДСД – 0,02 мг/кг массы тела человека; ПДК в воде водоемов – 0, 002 мг/дм^3; ПДК в почве – 0,02 мг/кг; МДУ в зерне и масле кукурузы – 0,05 мг/кг.

Область применения.

Форамсульфурон – послевсходовый гербицид системного действия из класса сульфонилмочевин. Механизм его действия связан с подавлением синтеза аминокислот с разветвленной цепью (валин и изолейцин), приводящего к прекращению клеточного деления и роста. Он эффективно уничтожает злаковые (*Echinochloa cruss-galli, Setaria spp., Elytrigia repens, Sorgum halepense*) и широколистные сорные растения в посевах кукурузы. Избирательность действия форамсульфурона в отношении кукурузы обусловлена его быстрой детоксикацией в этой культуре.

Проходит регистрационные испытания в РФ в качестве гербицида в составе смесевых препаратов на посевах зерновых злаков и кукурузы с нормой расхода 40—60 г д.в./га.

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, доверительный интервал среднего результата для полного диапазона концентраций ($n = 20$) приведены в табл. 2.

Таблица 1

Метрологические параметры

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	от 0,001до 0,01 вкл.	100	3,9	10,9	16,9
Почва	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	3,5	9,8	15,2
Кукуруза (зелёная масса)	от 0,05 до 0,1 вкл.	50	3,9	10,9	16,9
	более 0,1 до 0,5	25	2,9	8,1	12,5
Кукуруза (зерно)	от 0,05 до 0,10 вкл.	50	3,4	9,5	14,7
	более 0,10 до 0,50	25	2,0	5,6	8,7
Кукуруза (масло)	от 0,02 до 0,1 вкл.	50	3,0	8,4	13,0
	более 0,1 до 0,2	25	2,0	5,6	8,7

Таблица 2

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	0,001	0,001—0,01	91,7	3,6	± 3,4
Почва	0,01	0,01—0,1	84,0	5,4	± 5,1
Кукуруза (зелёная масса)	0,05	0,05—0,5	80,8	4,7	± 4,4
Кукуруза (зерно)	0,02	0,02—0,2	80,5	4,5	± 4,2
Кукуруза (масло)	0,02	0,02—0,2	80,0	4,4	± 4,1

2. Метод измерений

Методика основана на определении форамсульфурона с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором. Контроль форамсульфурона в образцах осуществляется по содержанию вещества после его экстракции из воды хлористым метиленом, из почвы смесью ацетонитрила и бикарбоната натрия, из зелёной массы и зерна кукурузы водным ацетоном, из масла кукурузы ацетонитрилом, очистки экстракта путем распределения действующего вещества между несмешивающимися растворителями при щелочном и кислом значениях pH и на колонке с силикагелем.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

В предлагаемых условиях анализа метод специфичен. Избирательность обеспечивается путем подбора колонки, состава подвижной фазы и условий хроматографирования.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостной хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны (фирмаWaters, США)	Номер Госреестра №16848—03
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 2104
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 7328
Иономер универсальный ЭВ-74	ГОСТ 22261
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770
Меры массы	ГОСТ 7328
Пипетки градуированные 2 класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 $см^3$	ГОСТ 29227
Пробирки градуированные с пришлифованной пробкой вместимостью 5 $см^3$	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные 2 класса точности вместимостью 25, 50, 100, 500 и 1 000 $см^3$	ГОСТ 1770

Допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Форамсульфурон, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 98,7 % (Байер, Германия)	
Ацетон, чда	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-3534—87
Вода бидистиллированная или деионизованная	ГОСТ 6702
н-Гексан, хч	ТУ 6-09-3375
Калий фосфорнокислый двузамещенный, чда	ГОСТ 2493
Кислота орто-фосфорная, хч, 85,6 %	ГОСТ 6552
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794
Натрия сульфат безводный, хч.	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый кислый, хч.	ГОСТ 4201-66
Натрий фосфорнокислый двузамещённый, двухводный, чда	ГОСТ 11773—76
Спирт метиловый, хч.	ГОСТ 6995—77

Допускается использование реактивов иных производителей с аналогичной или более высокой квалификацией

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851—78
Ванна ультразвуковая, модель D–50, фирма Branson Instr. Co. (США)	
Вата медицинская	ТУ 9393-001-00302238
Воронки делительные вместимостью 100 и 250 $см^3$	ГОСТ 25336
Воронки конусные диаметром 30—37 мм	ГОСТ 25336
Дефлегматор елочный	ГОСТ 9737
Колбы круглодонные на шлифе вместимостью 25 и100 $см^3$	ГОСТ 9737
Колонка хроматографическая стеклянная, длиной 25 см ивнутренним диаметром 8—10 мм	
Колонка хроматографическая, стальная, длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Диасфер 110-С18 (5 мкм)(ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва)	ТУ 4215-001-05451931—94
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 10696
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М Или ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi (Швейцария)	ТУ 25-11-917—74

Силикагель 60 (0,063—0,2 мм) для колоночной хроматографии (Мерк, Германия)	
Стаканы химические вместимостью 100 и 500 $см^3$	ГОСТ 25336
Стекловата	
Установка для перегонки растворителей	
Фильтры бумажные «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	ТУ 6-09-2678—77
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 100 $мм^3$, модель Microliter #1710 (Hamilton,США)	

Допускается применение другого оборудования с аналогичными или лучшими характеристиками.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими веществами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостной 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 допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя с опытом работы на жидкостном хроматографе.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

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 жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление растворов, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, подготовка колонки с силикагелем.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Очистка ацетона. Ацетон перегоняют над перманганатом калия и поташом (на 1 л ацетона 10 г $KMnO_4$ и 2 г K_2CO_3).

7.1.2. Очистка ацетонитрила. 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.

7.1.3. Очистка н-гексана. Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты до прекращения окрашивания ее в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над поташом.

7.1.4. Очистка хлористого метилена. Хлористый метилен встряхивают с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до тех пор, пока свежая порция кислоты не перестанет окрашиваться. Затем растворитель последовательно промывают водой, 2 %-м раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего сушат над гидроксидом натрия и перегоняют.

7.1.5. Очистка силикагеля. Силикагель 60 (0,063—0,20 мм) для колоночной хроматографии встряхивают с двойным объемом очищенного ацетона и затем фильтруют на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Силикагель на фильтре промывают 1,5 объемом ацетона и затем высушивают при температуре 130 °С в течение 5 ч.

7.2. Приготовление 2 М и 0, 005 М растворов орто-фосфорной кислоты

Для получения 2 М раствора H_3PO_4 в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$ вносят 137 $см^3$ 85,6 %-ной орто-фосфорной кислоты, добавляют 500—600 $см^3$ деионизованной воды, перемешивают и доводят объем водой до метки.

Для получения 0,005 М раствора H_3PO_4 отбирают 2,5 $см^3$ приготовленного 2 М раствора орто-фосфорной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, добавляют деионизованную воду до метки и перемешивают.

7.3. Приготовление 0,1 М раствора $K_2HPO_4 \times 3H_2O$

22,8 г $K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$ растворяют в химическом стакане в 400 $см^3$ деионизованной воды, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, добавляют деионизованную воду до метки и перемешивают.

7.4. Приготовление 0,06 М раствора $NaHCO_3$

5,04 г $NaHCO_3$ растворяют в химическом стакане в 400 $см^3$ деионизованной воды, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 000 $см^3$, добавляют деионизованную воду до метки и перемешивают.

7.5. Подготовка колонки с силикагелем для очистки экстракта

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см и внутренним диаметром 8—10 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 5 г силикагеля в 30 $см^3$ смеси ацетон–метанол (7 : 3, по объему). Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку промывают 20 $см^3$ смеси ацетон–метанол (8 : 2, по объёму) со скоростью 1—2 кап./сек, после чего она готова к работе.

7.6. Проверка хроматографического поведения форамсульфурона на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу вместимостью 10 $см^3$ помещают 0,1 $см^3$ градуировочного раствора форамсульфурона с концентрацией 10 мкг/$см^3$ в ацетонитриле (п. 7.9.2). Раствор упаривают досуха, остаток растворяют в 3 $см^3$ смеси ацетон–метанол (8 : 2, по объему), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку, подготовленную по п. 7.5. Промывают колонку 50 $см^3$ смеси ацетон–метанол (8 : 2, по объему) со скоростью 1—2 кап./сек, элюат отбрасывают. Затем колонку промывают

100 $см^3$ смеси ацетон–метанол (7 : 3, по объему). Фракционно (по 10 $см^3$) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 1 $см^3$ ацетонитрила, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин., вносят 2 $см^3$ подвижной фазы, подготовленной по п. 7.7, перемешивают и анализируют на содержание форамсульфурона по п. 9.4. Фракции, содержащие форамсульфурон, объединяют и вновь анализируют по п. 9.4. Рассчитывают содержание вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

Примечание: *Профиль вымывания форамсульфурона может меняться при* использовании новой партии сорбента и растворителей.

7.7. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

В мерную колбу вместимостью 1 000 см^3 помещают 400 см^3 ацетонитрила, доливают до метки 0, 005 М водным раствором ортофосфорной кислоты (п. 7.2), перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр, дегазируют.

7.8. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой, приготовленной по п. 7.7, при скорости подачи растворителя 1 см^3/мин не менее часа до установления стабильной базовой линии.

7.9. Приготовление градуировочных растворов

7.9.1. Исходный раствор форамсульфурона для градуировки (концентрация 100 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 0, 010 г форамсульфурона, растворяют в 40—50 см^3 ацетонитрила, доводят ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в морозильной камере при температуре не выше – 18 °С в течение месяца.

7.9.2. Раствор форамсульфурона № 1 для градуировки (концентрация 10 мкг/см^3). В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 10 см^3 исходного раствора форамсульфурона с концентрацией 100 мкг/см^3 (п. 7.8.1), разбавляют ацетонитрилом до метки. Этот раствор используют для приготовления рабочих градуировочных растворов №№ 2—5.

Для приготовления проб масла с внесением при оценке полноты извлечения форамсульфурона из исследуемых образцов используют ацетоновый раствор форамсульфурона с концентрацией 5 мкг/см^3.

Градуировочный раствор № 1 хранят в морозильной камере при температуре не выше – 18 °С в течение месяца.

7.9.3. Рабочие растворы №№ 2—5 форамсульфурона для градуировки (концентрация 0,02—0,20 мкг/см^3). В 4 мерные колбы вместимостью 100 см^3 помещают 0,2; 0,4; 1,0 и 2,0 см^3 градуировочного раствора № 1 форамсульфурона с концентрацией 10 мкг/см^3 (п. 7.9.2), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.7, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы №№ 2—5 с концентрацией форамсульфурона 0,02; 0,04; 0,10 и 0,20 мкг/см^3 соответственно.

Растворы готовят непосредственно перед использованием.

7.10. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мкВ·сек) от концентрации форамсульфурона в растворе

(мкг/см^3), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки.

В инжектор хроматографа вводят по 5 мм^3 каждого градуировочного раствора (п. 7.9.3) и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 3 параллельных измерений.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051-79 от 21.08.79 г.) и правилами, определенными ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 1743.01—83 «Почвы. Общие требования к отбору проб», 26950—89 «Почвы. Отбор проб», ГОСТ Р 50436—92 «Зерновые. Отбор проб зерна».

Пробы воды анализируют в день отбора или замораживают и хранят в полиэтиленовой таре в морозильной камере при температуре – 18 °С не более 2 недель.

Образцы почвы подсушивают на воздухе в темноте, помещают в герметичную полиэтиленовую тару и хранят в холодильнике при температуре 4—6 °С не более 4 недель. Для длительного хранения образцы почвы замораживают и хранят при температуре – 18 °С.

Пробы зеленой массы кукурузы хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 1 дня; для длительного хранения пробы замораживают и хранят при – 18 °С.

Пробы зерна высушивают до стандартной влажности и хранят в холодильнике при температуре 4 °С.

Масло хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике при температуре 4—6 °С. В некоторых случаях масло получают из зерна кукурузы экстракцией органическими неполярными растворителями (петролейный и диэтиловый эфиры) непосредственно перед проведением анализа.

Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр, образцы почвы просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм, зерно размалывают на мельнице, а зеленую массу измельчают ножом.

9.Выполнение определения

9.1. Экстракция форамсульфурона

9.1.1. Вода. К образцу предварительно отфильтрованной воды объемом 100 см^3 добавляют 2,28 г $K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$, перемешивают до рас-

творения соли, контролируют pH раствора с помощью иономера и доводят до 9 с помощью 1 N раствора гидроксида калия. Полученный раствор переносят в делительную воронку емкостью 250 $см^3$, приливают 25 $см^3$ хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После расслоения органическую фазу отбрасывают, а водную фракцию еще дважды обрабатывают хлористым метиленом порциями по 15 $см^3$. Водную фракцию переносят в химический стакан, подкисляют 2 М орто-фосфорной кислотой до pH 3, контролируя кислотность раствора с помощью иономера. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, приливают 25 $см^3$ хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения слоев органическую фазу собирают. Операцию экстракции водной фазы повторяют еще дважды, используя по 15 $см^3$ хлористого метилена. Объединенную органическую фазу пропускают через слой хлопковой ваты и упаривают на роторном испарителе досуха при температуре 40 °С. Сухой остаток растворяют в 5 $см^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ (п. 7.7) и анализируют на содержание форамсульфурона по п. 9.4.

9.1.2. Почва. Навеску (20 г) воздушно-сухой почвы помещают в плоскодонную колбу емкостью 250 $см^3$, приливают 80 $см^3$ смеси ацетонитрил – 0,06 М $NaHCO_3$ (1 : 1, по объёму), встряхивают в течение 30 мин на аппарате для встряхивания. Суспензию помещают в ультразвуковую баню на 3 мин, центрифугируют 5 мин при 6 000 g и супернатант фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. К остатку почвы в центрифужной пробирке приливают 40 $см^3$ смеси ацетонитрил – 0,06 М $NaHCO_3$ (1 : 1, по объёму), перемешивают и центрифугируют. Объединенный экстракт упаривают до водного остатка, доводят объём водой до 40 $см^3$ и обрабатывают хлористым метиленом по пп. 9.2.

9.1.3. Зерно. Образец размолотого зерна массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ смеси ацетон–вода (90 : 10, по объему) и помещают на встряхиватель на 30 мин. Суспензию обрабатывают в ультразвуковой бане в течение 3 мин и фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывают 50 $см^3$ смеси ацетон–вода (90 : 10, по объему). Объединенный экстракт упаривают до водного остатка (около 5 $см^3$), добавляют 0,1 М K_2HPO_4 до объёма 50 $см^3$ и проводят очистку по п. 9.2.

9.1.4. Зеленая масса. Образец растительного материала массой 20 г помещают в стакан гомогенизатора вместимостью 500 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ смеси ацетон–вода (90 : 10, по объему) и гомогенизируют 3 мин. при 10 000 об/мин. Гомогенат фильтруют под вакуумом на воронке

Бюхнера через бумажный фильтр в колбу вместимостью 250 $см^3$. Осадок на фильтре промывают 50 $см^3$ смеси ацетон–вода (90 : 10, по объему). Объединенный экстракт упаривают до водного остатка (около 5 $см^3$) добавляют 0,1 М K_2HPO_4 до объёма 50 $см^3$ и проводят очистку по п. 9.2.

9.1.5 Масло. Образец масла массой 5 г вносят в плоскодонную колбу вместимостью 250 $см^3$, добавляют 10 $см^3$ гексана и перемешивают. К раствору добавляют 50 $см^3$ ацетонитрила и содержимое интенсивно встряхивают в течение 30 мин. Верхний ацетонитрильный слой собирают после разделения фаз в делительной воронке вместимостью 250 $см^3$. Операцию экстракции масляной фазы повторяют еще два раза, используя по 30 $см^3$ ацетонитрила.

Ацетонитрильный экстракт фильтруют через слой ваты, которую промывают после фильтрации 10 $см^3$ ацетонитрила. Объединённый ацетонитрильный экстракт переносят в делительную воронку вместимостью 250 $см^3$, добавляют 10 $см^3$ гексана, насыщенного ацетонитрилом, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После расслоения фаз гексановый слой отбрасывают, а ацетонитрильную фракцию фильтруют через слой ваты в круглодонную колбу и упаривают до маслянистого остатка на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. Остаток растворяют в 50 $см^3$ 0,1 М K_2HPO_4 и проводят очистку по п. 9.2.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Экстракт, полученный по пп. 9.1.2, 9.1.3, 9.1.4 и 9.1.5, переносят в делительную воронку вместимостью 100 $см^3$, приливают 25 $см^3$ хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После расслоения органическую фазу отбрасывают, а водную фракцию еще дважды обрабатывают хлористым метиленом порциями по 15 $см^3$. Водную фракцию переносят в химический стакан, подкисляют 2 М ортофосфорной кислотой до pH 3, контролируя кислотность раствора с помощью иономера. Раствор переносят в делительную воронку вместимостью 100 $см^3$, приливают 25 $см^3$ хлористого метилена, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После разделения слоев органическую фазу фильтруют через 1 слой хлопковой ваты в мерный цилиндр вместимостью 100 $см^3$. Операцию экстракции водной фазы повторяют еще дважды, используя по 15 $см^3$ хлористого метилена. Измеряют объем объединенной органической фазы и часть ее, эквивалентную 1 г зерна, масла и зелёной массы, либо 2 г почвы, переносят в круглодонную колбу вместимостью 25 $см^3$. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. Дальнейшую очистку экстракта проводят по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Сухой остаток в колбе, полученный по п. 9.2, растворяют в 3 $см^3$ смеси ацетон–метанол (8 : 2, по объёму), помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин. Раствор наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по п. 7.5. Колбу обмывают 2 $см^3$ смеси ацетон–метанол (8 : 2, по объёму), которые также наносят на колонку. Колонку последовательно промывают 45 $см^3$ смеси ацетон–метанол (8 : 2, по объёму) и 10 $см^3$ смеси ацетон–метанол (7 : 3, по объёму) со скоростью 1–2 кап/сек, элюат отбрасывают. Форамсульфурон элюируют с колонки 60 $см^3$ смеси ацетон–метанол (7 : 3, по объёму), элюат собирают в круглодонную колбу вместимостью 100 $см^3$ и упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре 40 °С. Сухой остаток экстрактов почвы, зерна и масла растворяют в 1 $см^3$, зелёной массы – в 2,5 $см^3$ подвижной фазы для ВЭЖХ, подготовленной по п. 7.7, помещая в ультразвуковую ванну на 1 мин., и анализируют на содержание форамсульфурона по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Жидкостной хроматограф с программным обеспечением Breeze фирмы Waters (США) с ультрафиолетовым детектором, модель 2487.

Колонка стальная длиной 15 см, внутренним диаметром 4 мм, содержащая Диасфер 110-С18, зернением 6 мкм.

Температура колонки: комнатная.

Подвижная фаза: ацетонитрил – 0,005 М орто-фосфорная кислота (40 : 60).

Скорость потока элюента: 0,5 $см^3$/мин.

Рабочая длина волны: 250 нм.

Чувствительность: 0,01 ед. абсорбции на шкалу.

Объем вводимой пробы: 5 $мм^3$.

Время удерживания форамсульфурона: 6,2 мин.

Линейный диапазон детектирования: 0,1—2,0 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем стандартный раствор с концентрацией 0,2 мкг/$см^3$, разбавляют подвижной фазой для ВЭЖХ.

10. Обработка результатов анализа

Содержание форамсульфурона рассчитывают методом абсолютной калибровки по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times A \times V}{S_0 \times m}, \text{ где}$$

X – содержание форамсульфурона, мг/дм^3, мг/кг;

S_1 – площадь пика образца, мкВ*с;

S_0 – площадь пика стандарта, мкВ*с;

A – концентрация стандартного раствора форамсульфурона, мкг/см^3;

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

m – масса анализируемой части образца (для воды – 100 см^3, почвы – 2 г, зелёной массы, зерна и масла – 1 г.)

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости (1):

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

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

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

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

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

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

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

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

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

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 нижней границы определения»

*< 0, 001 мг/дм^3 * для воды, < 0,01 мг/кг** для почвы, < 0,05 мг/кг*** для зеленой массы кукурузы, < 0,02 мг/кг**** для зерна и масла кукурузы*

**0,00 мг/дм^3 – предел обнаружения для воды.*

***0,01 мг/кг – предел обнаружения для почвы.*

****0,05 мг/кг – предел обнаружения для зеленой массы кукурузы.*

*****0,02 мг/кг – предел обнаружения для зерна и масла кукурузы.*

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 с применением метода добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д \approx \Delta_{л,\overline{X}} + \Delta_{л,\overline{X'}}, \text{ где}$$

$\pm\Delta_{л,\overline{X}}\left(\pm\Delta_{л\,\overline{X'}}\right)$ – 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:

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\Delta,$$

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг;

$$\Delta = \frac{\delta \times X}{100},$$

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_k = \overline{X'} - \overline{X} - C_д, \text{ где}$$

$\overline{X'}$, $\overline{X}, C_д$- 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

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_k| \le K \qquad (2)$$

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)

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

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

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

14. Разработчики

Микитюк О. Д., ст. науч. сотр., канд. биол. наук; Назарова Т. А., науч. сотр., канд. биол. наук; Макеев А. М., зав. лаб., канд. биол. наук.

ВНИИ фитопатологии, 143050, Московская обл., п/о Большие Вяземы, тел. 692-92-20.

Подпись руки Микитюка О.Д., Назаровой Т.А., Макеева А.М. заверяю Зав. канцелярией ВНИИФ

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

Методические указания
МУК 4.1.2546—09

Технический редактор А. В. Терентьева

Подписано в печать 11.11.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 200 экз.

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

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

gost.e-ecolog.ru