Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пенфлуфена в воде, почве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3027—12

Издание официальное

Москва
2013

gost.e-ecolog.ru

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

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пенфлуфена в воде, почве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3027—12

ББК 51.21+51.53
О60
О60 **Определение** остаточных количеств пенфлуфена в воде, почве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—23 с.

ISBN 978—5—7508—1192—2

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (В. Н. Ракитский, Т. В. Юдина, Н. Е. Федорова, В. Н. Волкова, Л. П. Мухина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3 Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 3 июля 2012 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.21+51.53

© **Роспотребнадзор, 2013**
© ***Федеральный центр гигиены*** **и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013**

Содержание

1. Метрологические характеристики 5
2. Метод измерений 6
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 7
4. Требования безопасности 11
5. Требования к квалификации операторов 11
6. Условия измерений 11
7. Подготовка к выполнению измерений 11
8. Отбор и хранение проб 16
9. Выполнение определения 17
10. Обработка результатов анализа 20
11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений 20
12. Оформление результатов 21
13. Контроль качества результатов измерений 21

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
3 июля 2012 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств пенфлуфена в воде, почве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

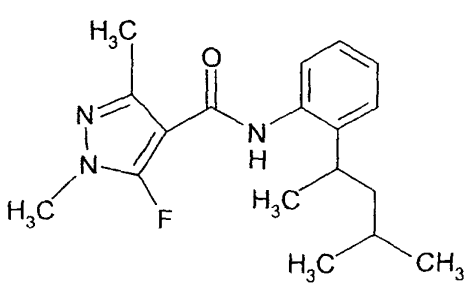
Методические указания
МУК 4.1.3027—12

Свидетельство о метрологической аттестации № 00121.22.05.12 от 22.05.2012.

Настоящие методические указания устанавливают метод высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения массовых концентраций пенфлуфена в воде, почве и клубнях картофеля в диапазонах 0,0005—0,005 мг/дм³, 0,01—0,1 и 0,01—0,1 мг/кг соответственно.

Пенфлуфен

2'-[(RS)-1,3-диметилбутил]-5-фтор-1,3-диметил-1Н-пиразол-4-карбоксанилид (IUPAC)



$C_{18}H_{24}FN_3O$

Мол. масса 317,4

Белое кристаллическое вещество. Температура плавления 111 °С. Давление паров $4,1\times10^{-7}$ Па (при 20 °С); $1,2\times10^{-6}$ Па (при 25 °С). Растворимость в органических растворителях при 20 °С (г/дм³): ацетон – 139; н-гексан – 1,6; диметилсульфоксид – 162; дихлорметан > 250; метанол – 126; толуол – 62; этилацетат –96. Растворимость в воде при 20 °С (мг/дм³): 11,0 (pH 4); 10,9 (pH 7); 11,2 (pH 9). Пенфлуфен гидролитически стабилен в кислых, нейтральных и щелочных условиях при комнатной температуре.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для крыс > 2000 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 2022,5 мг/м³.

Область применения

Пенфлуфен – системный фунгицид широкого спектра действия класса пиразолов, рекомендуется к применению на картофеле для обработки клубней до или во время посадки.

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/дм³ (мг/кг)	Показатель точности (граница относительной погрешности), %, P = 0,95	Стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %	Норматив оперативного контроля точности, K, мг/дм³ (мг/кг), (P = 0,95, m = 2)
1	2	3	4	5	6	7
Вода	от 0,0005 до 0,005 вкл.	50	3,7	10	14	$0,59\times\overline{X}^*$

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Почва	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	4,1	11	16	$0,59 \times \overline{X}^*$
Клубни картофеля	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	4,2	12	17	$0,59 \times \overline{X}^*$

* $\overline{X}$ – среднее значение массовой концентрации пенфлуфена в пробе (мг/дм^3, мг/кг)

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/дм^3 (мг/кг)	Диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3 (мг/кг)	Полнота извлечения вещества, %	Стандартное отклонение, %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Вода	0,0005	0,0005—0,005	91,24	3,43	1,83
Почва	0,01	0,01—0,1	89,74	4,03	2,15
Клубни картофеля	0,01	0,01—0,1	86,18	4,17	2,22

2. Метод измерений

Метод основан на определении пенфлуфена с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ультрафиолетовым детектором после гомогенизирования анализируемого образца измельченного картофеля с флорисилом, последующей экстракции пенфлуфена системой растворителей дихлорметан-ацетон и очистки экстракта на патронах для твердофазной экстракции C18 Sep Pak Classic; извлечения вещества из анализируемого образца почвы водным ацетонитрилом, очистки экстракта перераспределением между двумя несмешивающимися фазами и на колонке с оксидом алюминия. Для концентрирования и очистки пробы воды использованы патроны для твердофазной экстракции C18 Sep Pak Classic.

Количественное определение проводится методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны фирмы «Agilent»	Номер Госреестра 16193—06
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104—2001
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 24104—2001
Колбы мерные вместимостью 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1 000-2	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ 7328—2001
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 см^3	ГОСТ 29227—91
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100, 250, 500 и 1 000 см^3	ГОСТ 1770—74

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

3.2. Реактивы

Пенфлуфен, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 99,2 %, CAS 494793-67-8 (фирма «Bayer CropScience»)	
Ацетон	ГОСТ 2603—79
Ацетонитрил для хроматографии, хч	ТУ 6-09-14-2167—84
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистилированная)	ГОСТ Р 52501—2005
н-Гексан, хч	ТУ 2631-003-05807999—98

Калий марганцово-кислый (перманганат калия), хч	ГОСТ 20490—75
Калий углекислый (карбонат калия), хч, прокаленный	ГОСТ 4221—76
Кальций хлористый (хлорид кальция), хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 450—77
Кислота ортофосфорная, хч, 85 %	ГОСТ 6552—80
Кислота серная концентрированная	ГОСТ 14262—78
Метилен хлористый (дихлорметан), хч	ГОСТ 12794—80
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Натрия гидроокись (гидроксид натрия), хч	ГОСТ 4328—77
Натрий серно-кислый (сульфат натрия) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый (карбонат натрия), хч	ГОСТ 83—79
Оксид алюминия (окись алюминия) для хроматографии, нейтральный, 50 -200 микрон, CAS 1344-28-01 (фирма «ACROS ORGANICS», Бельгия)	
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора)	ТУ 6-09-4173—85
Флорисил (60—100 меш), адсорбент для хроматографии («Флука», Швейцария)	

Примечание. Допускается использование реактивов иных производителей с более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные средства измерений, устройств и материалы

Аллонж прямой с отводом для вакуума (для работы с концентрирующими патронами)	
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с или орбитальный шейкер OS-10, диапазон регулировки оборотов 50—200 об./мин, орбита до 10 мм	ТУ 64-1-2851—78

Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Бумага индикаторная универсальная pH 1—10	ТУ 6-09-1181—89
Бумажные фильтры «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	ТУ 2642-001--05015242—07
Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронка делительная вместимостью 250 см³	ГОСТ 9737—93
Воронки стеклянные конусные типа В-36-80 ХС и В-56-80 ХС	ГОСТ 25336—82
Груша резиновая	ТУ 9398-05-0576--9082—2003
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90%, типа ВИТ-2	ТУ 25-11-1645—84
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колбы конические (плоскодонные) с пришлифованной пробкой вместимостью 250—300 см³	ГОСТ 23932—90
Колбы круглодонные на шлифе (для упаривания) вместимостью 50, 150 и 250 см³	
Стеклянная колонка длиной 30 см, внутренним диаметром 18 мм	
Стеклянная колонка длиной 25 см, внутренним диаметром 15 мм	
Стеклянные палочки	
Мембранные фильтры микропористые, марки ММК, капроновые, диаметром 50 мм, размер пор 0,45 мкм	ТУ 9471-002--10471723—2003
Набор для фильтрации растворителей через мембрану	

Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 25336—82
Патроны для твердофазной экстракции (картриджи) C18 Sep Pak Classic (360 mg), WAT051910 (Waters, США)	
Сито с диаметром отверстий 1 мм	
Стаканы химические вместимостью 400 см^3	ГОСТ 25336—82
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	
Ротационный вакуумный испаритель B-169 фирмы Buchi, Швейцария	
Установка для перегонки растворителей	
Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, содержащая Eclipse XDB C18, зернение 5 мк	
Термометр с диапазоном измерений от 0 до 55 °С и ценой деления 0,1 °С	
Центрифуга роторная, скорость вращения до 3 500 об./мин, с центрифужными стаканами объемом 100 см^3	
Барометр-анероид М-67	ТУ 2504-1797—75
Шприц для ввода образцов для жидкостного хроматографа вместимостью 50—100 мм^3	
Шприц медицинский инъекционный однократного применения вместимостью 10 см^3	ГОСТ 24861—91 (ИСО 7886—84)

Примечание. Допускается использование вспомогательных средств измерений и устройств иных производителей, технические характеристики которых не уступают указанным, а также материалов, обеспечивающих нормативы точности при проведении измерений.

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 12.1.019—2009, а также требования, изложенные в технической документации на жидкостный хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать ПДК (ОБУВ), установленных ГН 2.2.5.1313—03, 2.2.5.2308—07 и 1.2.2701—10. Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалистов, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на жидкостном хроматографе, освоивших данную методику и подтвердивших экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

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 градуировочных растворов, раствора внесения, подвижной фазы для ВЭЖХ, кондиционирование хроматографической колонки, установление градуировочной характеристики, приготовление растворов, подготовка колонок с оксидом алюминия и флориси-

лом, концентрирующих патронов, проверка хроматографического поведения пенфлуфена на колонке с оксидом алюминия, патроне C18 Sep Pak Classic.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетон

Ацетон перегоняют над небольшим количеством перманганата калия и прокаленным карбонатом калия (на 1 дм³ ацетона 10 г перманганата калия и 2 г карбоната калия) или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30.

7.1.2. Ацетонитрил

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора (на 1 дм³ ацетонитрила 20 г пентоксида фосфора) не менее 1 ч, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия (на 1 дм³ ацетонитрила 10 г карбоната калия).

7.1.3. Гексан

7.1.3.1. Приготовление раствора гидроксида натрия с массовой долей 2,0 %

В мерную колбу вместимостью 250 см³, содержащую 100—150 см³ бидистиллированной воды, помещают (5,0 ± 0,1) г натрия гидроксида, доводят водой до метки, тщательно перемешивают.

7.1.3.2. Очистка гексана

Гексан встряхивают в делительной воронке с небольшими порциями концентрированной серной кислоты до прекращения визуально наблюдаемого окрашивания свежей порции кислоты, затем промывают водой, 2 %-м раствором гидроксида натрия и снова водой, после чего сушат над гидроксидом натрия и перегоняют.

7.1.4. Хлористый метилен

7.1.4.1. Приготовление раствора натрия углекислого с массовой долей 5 %

Навеску (25 ± 0,1) г натрия углекислого помещают в мерную колбу вместимостью 500 см³, растворяют в бидистиллированной воде, доводят водой до метки, перемешивают.

7.1.4.2. Очистка растворителя

Растворитель 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.

7.2. Подготовка подвижной фазы для ВЭЖХ

7.2.1. Приготовление раствора ортофосфорной кислоты с объемной долей 0,2 % (0,2 %-й раствор)

В мерную колбу вместимостью 1 000 см³ помещают 250—300 см³ бидистиллированной воды, вносят 2 см³ ортофосфорной кислоты, доводят водой до метки, перемешивают.

7.2.2. Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу вместимостью 1 000 см³ помещают 600 см³ ацетонитрила, вносят 400 см³ 0,2%-го раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают, фильтруют через мембранный фильтр.

7.3. Кондиционирование хроматографической колонки

Промывают колонку подвижной фазой (приготовленной по п. 7.2.) при скорости подачи растворителя 0,8 см³/мин до установления стабильной базовой линии.

7.4. Приготовление градуировочных растворов и раствора внесения

7.4.1. Исходный раствор пенфлуфена для градуировки (концентрация 100 мкг/см³)

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,01 г пенфлуфена, растворяют в 50—60 см³ ацетонитрила, доводят ацетонитрилом до метки, тщательно перемешивают.

Раствор хранят в морозильной камере при температуре –18 °С в течение 3 месяцев.

Растворы № 1—5 готовят объемным методом путем последовательного разбавления исходного раствора для градуировки.

7.4.2. Раствор № 1 пенфлуфена для градуировки и внесения (концентрация 10 мкг/см³)

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 10 см³ исходного раствора пенфлуфена с концентрацией 100 мкг/см³ (п. 7.4.1), разбавляют ацетонитрилом до метки.

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

Этот раствор используют для приготовления проб с внесением при оценке полноты извлечения действующего вещества методом

«внесено—найдено», а также контроле качества результатов измерений методом добавок.

7.4.3. Рабочие растворы № 2—5 пенфлуфена для градуировки (концентрация 0,1—1,0 мкг/см³)

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают по 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0 см³ градуировочного раствора № 1 с концентрацией 10 мкг/см³ (п. 7.4.2), доводят до метки подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2, тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией пенфлуфена 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 мкг/см³, соответственно.

Рабочие растворы сразу после приготовления помещают в холодильник, где они хранятся при температуре 4—6 °С не более 10 дней.

7.5. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мЕА · с) от концентрации пенфлуфена в растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки № 2—5.

В инжектор хроматографа вводят по 20 мм³ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.4. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений. Устанавливают площади пиков действующего вещества, на основании которых строят градуировочную зависимость.

7.6. Подготовка колонки с флорисилом

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 30 см, внутренним диаметром 18 мм уплотняют тампоном из стекловаты, насыпают 2 г безводного сульфата натрия, сверху помещают 1 г флорисила.

7.7. Приготовление смеси хлористый метилен-ацетон (объемное соотношение 9:1) для очистки картофеля на колонке с флорисилом

В мерную колбу вместимостью 500 см³ помещают 450 см³ хлористого метилена и 50 см³ ацетона, перемешивают.

7.8. Подготовка колонки с оксидом алюминия для очистки экстракта

Оксид алюминия сушат в сушильном шкафу при 150 °С в течение 2 ч охлаждают в эксикаторе, затем дезактивируют 3 % воды по массе (II степень активности по Брокману).

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 15 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 3 г оксида алюминия в 10 см³ ацетонитрила. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента и помещают на него слой безводного сульфата натрия высотой 0,5 см. Колонку промывают 10 см³ ацетонитрила со скоростью 1—2 капли в секунду. Колонка готова к работе.

7.9. Проверка хроматографического поведения пенфлуфена на колонке с оксидом алюминия

В круглодонную колбу вместимостью 10 см³ помещают 0,5 см³ раствора № 1 пенфлуфена с концентрацией 10 мкг/см³ (п. 7.4.2), упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 10 см³ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки колбы и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.8. Элюат собирают и упаривают досуха при температуре не выше 35 °С. Исходную колбу обмывают еще двумя порциями ацетонитрила объемом 10 см³ каждая и последовательно наносят на колонку. Каждую порцию собирают в отдельные колбы и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С.

Сухой остаток каждой фракции растворяют в 2 см³ подвижной фазы для ВЭЖХ, анализируют содержание пенфлуфена по п. 9.4.

Фракции, содержащие пенфлуфен, объединяют и вновь анализируют.

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

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

7.10. Подготовка концентрирующих патронов C18 Sep Pak Classic

Патроны C18 Sep Pak Classic устанавливают на аллонж с прямым отводом для вакуума. Сверху в патрон C18 Sep Pak Classic устанавливают медицинский шприц объемом не менее 10 см³, используемый в качестве емкости для элюента.

Концентрирующие патроны промывают последовательно 3 см³ метанола, затем 5 см³ бидистиллированной воды. Процедуру проводят с использованием вакуума, скорость потока растворителей через патрон не должна превышать 5 см³/мин, при этом нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

Примечание. В отсутствие специального аллонжа, жидкость продавливают через патрон с помощью шприца, скорость продавливания раствора не должна превышать 2—3 капли в секунду.

7.11. Проверка хроматографического поведения пенфлуфена на концентрирующем патроне C18 Sep Pak Classic

В круглодонную колбу вместимостью 50 см³ помещают 0,2 см³ градуировочного раствора № 1 пенфлуфена с концентрацией 10 мкг/см³ (п. 7.4.2), растворитель упаривают досуха при температуре не выше 35 °С, остаток растворяют в 10 см³ смеси ацетонитрил-вода (1 : 9, по объему) и вносят на концентрирующий патрон, подготовленный по п. 7.10. Скорость прохождения раствора через патрон не должна превышать 2—3 капли в секунду. Элюат отбрасывают.

Промывают патрон 10 см³ смеси ацетонитрил—вода (20 : 80, по объему). Высушивают патрон пропусканием воздуха (с использованием вакуума) в течение 2 мин. Пенфлуфен элюируют с патрона 10 см³ ацетонитрила, собирая 2 порции элюата по 5 см³ каждая непосредственно в круглодонные колбы. Растворы в колбах упаривают досуха при температуре не выше 35 °С. Остаток в каждой колбе растворяют в 2 см³ подвижной фазы (приготовленной по п. 7.2) и анализируют содержание пенфлуфена по п. 9.4. При обнаружении вещества только в первой фракции элюирование пенфлуфена с патрона осуществляют 5 см³ ацетонитрила; при наличии его в обеих, объем элюента увеличивают до 10 см³.

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

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ: вода – ГОСТ Р 51592—2000 «Вода. Общие требования к отбору проб»; почва – ГОСТ 17.4.3.01—83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб», ГОСТ 28168—89 «Почвы. Отбор проб»; картофель – ГОСТ 51808—2001 «Картофель свежий продовольственный, реализуемый в розничной торговой сети. ТУ», ГОСТ 7176—85 «Картофель свежий продовольственный, заготовляемый и поставляемый. ТУ», ГОСТ 26832—86 «Картофель свежий для переработки на продукты питания.ТУ», ГОСТ 6014—68 «Картофель свежий для переработки. ТУ» и «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Пробы клубней картофеля хранят до анализа в морозильной камере при температуре −18 °С. Перед анализом их гомогенизируют. Отобранные пробы воды хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более суток. Почву подсушивают в темноте до постоянного веса и хранят в защищенном от света месте при комнатной температуре не более месяца. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре −18 °С. Перед анализом образцы воды фильтруют через неплотный бумажный фильтр, почвы – просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм.

9. Выполнение определения

9.1. Вода

Образец отфильтрованной воды объемом 200 см³ вносят на концентрирующий патрон С18 Sep Pak Classic, подготовленный по п. 7.10., со скоростью пропускания раствора 2—3 капли в секунду. используя разряжение, создаваемое водоструйным насосом. После нанесения пробы патрон промывают 10 см³ смеси ацетонитрил—вода (10 : 90, по объему), затем 10 см³ смеси ацетонитрил—вода (20 : 80, по объему), элюаты отбрасывают. Вещество элюируют с патрона 5 см³ ацетонитрила, собирая элюат в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 50 см³. Растворитель упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С досуха, остаток растворяют в 1 см³ подвижной фазы, приготовленной по п. 7.2, и анализируют содержание пенфлуфена по п. 9.4.

9.2. Почва

9.2.1. Экстракция

Образец воздушно-сухой почвы массой 20 г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 250—300 см³, вносят 10 см³ воды и выдерживают 5 мин при комнатной температуре, после чего добавляют 50 см³ ацетонитрила и экстрагируют пенфлуфен в течение 5 мин на ультразвуковой бане, затем дополнительно 5 мин на аппарате для встряхивания. Пробу центрифугируют в течение 5 мин при скорости 2 000 оборотов в минуту, дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной фильтр «красная лента». Почвенный остаток повторно дважды экстрагируют ацетонитрилом порциями по 50 см³ с использованием ультразвуковой бани, аппарата для встряхивания, центрифуги.

Объединенный отфильтрованный экстракт переносят в делительную воронку объемом 250 см³, добавляют 50 см³ гексана и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. После полного разделения фаз верхний слой (гексан) отбрасывают, а ацетонитрильный слой промывают еще одной порцией гексана объемом 50 см³, которую также отбрасывают. Ацетонитрильный слой переносят в круглодонную колбу на 250 см³ и упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С до водного остатка (объем 5—10 см³) и далее очищают перераспределением в системе несмешивающихся растворителей по п. 9.2.2, затем на колонке с оксидом алюминия по п. 9.2.3.

9.2.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток в колбе, полученный по п. 9.2.1, переносят в делительную воронку вместимостью 250 см³, туда же добавляют 5 см³ ацетонитрила, предварительно обмыв им колбу, в которой находилась проба, а также 100 см³ воды. К смеси добавляют 10 г сухого хлорида натрия и интенсивно перемешивают до полного растворения соли. Пенфлуфен экстрагируют тремя порциями хлористого метилена объемом по 30 см³, каждый раз интенсивно встряхивая смесь в течение 2 мин. После полного разделения фаз нижний дихлорметановый слой собирают в колбу для упаривания, пропуская его через слой безводного сульфата натрия. Объединенный экстракт упаривают досуха при температуре не выше 35 °С.

9.2.3. Очистка экстракта на колонке с оксидом алюминия

Сухой остаток, полученный по п. 9.2.2, растворяют 10 см³ ацетонитрила, тщательно обмывая стенки колбы, и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.8. Элюат собирают, исходную колбу обмывают еще двумя порциями ацетонитрила объемом 10 см³ каждая и последовательно их наносят на колонку. Элюаты объединяют и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Остаток в колбе растворяют в 2 см³ подвижной фазы для ВЭЖХ, приготовленной по п. 7.2, и анализируют содержание пенфлуфена по п. 9.4.

9.3. Клубни картофеля

9.3.1. Экстракция

Образец измельченных клубней картофеля массой 10 г помещают в химический стакан вместимостью 400 см³, порциями при перемешивании вносят 15 г флорисила, продолжают перемешива-

ние до получения сыпучего состояния. Затем пробу переносят (насыпая небольшими порциями через воронку) в колонку, подготовленную по п. 7.6. Заполненная колонка не должна содержать пустот. Колонку смачивают 20 см³ смеси хлористый метилен—ацетон (9 : 1, по объему), приготовленной по п. 7.7.

Пенфлуфен элюируют с колонки этой же смесью объемом 110 см³ со скоростью 2—3 капли в секунду непосредственно в круглодонную колбу вместимостью 250 см³, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С.

9.3.2. Очистка экстракта на концентрирующем патроне С18 Sep Pak Classic

Сухой остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.3.1, растворяют в 0,5 см³ ацетонитрила, помещая в ультразвуковую баню на 1 мин, добавляют 4,5 см³ воды и вносят на концентрирующий патрон С18 Sep Pak Classic, подготовленный по п. 7.10. Скорость прохождения раствора через патрон не должна превышать 2—3 капли в секунду. Элюат отбрасывают.

Промывают патрон 10 см³ смеси ацетонитрил—вода (20 : 80, по объему). Высушивают патрон пропусканием воздуха (с использованием вакуума) в течение 2 мин. Пенфлуфен элюируют с патрона 10 см³ ацетонитрила, растворитель упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 35 °С. Остаток растворяют в 1 см³ подвижной фазы и анализируют содержание пенфлуфена по п. 9.4.

9.4. Условия хроматографирования

Жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым детектором с переменной длиной волны.

Хроматографическая колонка стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, содержащая Eclipse XDB C18, зернение 5 мкм.

Температура колонки: 25 °С.

Подвижная фаза: ацетонитрил—0,2 %-я ортофосфорная кислота (60 : 40, по объему).

Скорость потока элюента: 0,8 см³/мин.

Рабочие длины волн: 236 или 254 нм.*

Объем вводимой пробы: 20 мм³.

Линейный диапазон детектирования: 2—20 нг.

Ориентировочное время выхода пенфлуфена: 7,8—8,0 мин.

---

* Хроматографирование пробы при двух видах волн повышает надежность идентификации.

Пробу вводят в инжектор хроматографа не менее двух раз. Устанавливают площади пиков вещества (мЕА · с), находят среднее значение, с помощью градуировочной характеристики определяют концентрацию пенфлуфена в хроматографируемом растворе.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 1,0 мкг/см³, разбавляют подвижной фазой, приготовленной по п. 7.2, не более чем в 50 раз.

10. Обработка результатов анализа

Содержание пенфлуфена в пробе (X, мг/дм³, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \times V}{m}, \text{ где}$$

C – концентрация пенфлуфена, найденная по градуировочной характеристике в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m – объем (масса) анализируемого образца, см³ (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):

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

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/дм³, 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.

Примечание. Идентификация и расчет концентрации вещества в пробах могут быть проведены с помощью компьютерной программы обработки хроматографических данных, включенной в аналитическую систему

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$\left(\overline{X} \pm \Delta\right)$ мг/дм³, мг/кг при вероятности P = 0,95, где

$\overline{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/дм³, мг/кг;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/дм³, мг/кг.

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

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 пенфлуфена в пробе воды – менее 0,0005 мг/дм³, почвы и клубнях картофеля – менее 0,01 мг/кг»**.

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. 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 пенфлуфена в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 мкг/см³.

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

* Пределы обнаружения пенфлуфена в пробах воды, почвы и клубнях картофеля – 0,0005 мг/дм³ и 0,01 мг/кг соответственно.

$$A = \frac{(X - C) \times 100}{C} \leq 3{,}0, \text{ где}$$

X – концентрация пенфлуфена в пробе при контрольном измерении, мкг/см³;

C – известная концентрация градуировочного раствора пенфлуфена, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см³;

3,0 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (А) превышает 3,0 %, 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 пенфлуфена, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.5.

Стабильность результатов измерений контролируют перед проведением измерений, анализируя один из градуировочных растворов.

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа

Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится методом добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д \geq \Delta_{л,\bar{X}} + \Delta_{л,\bar{X}'}, \text{ где}$$

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

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\Delta, \text{ где}$$

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/дм³, мг/кг.

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

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

Результат контроля процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

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

$\overline{X'}, \overline{X}, C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки соответственно, мг/дм³, мг/кг.

Норматив контроля K рассчитывают по формуле:

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

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

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K , \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (2) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (2) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R).

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

X_1, X_2 – результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/дм³, мг/кг;

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

Определение остаточных количеств пенфлуфена в воде, почве и клубнях картофеля методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3027—12

Редактор Н. В. Кожока

Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 1.03.13

Формат 60×88/16 Печ. л. 1,5
Тираж 200 экз. Заказ 18

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
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru